

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS  
NANOESTRUTURADOS E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ASSOCIAÇÃO ENTRE  
NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS E O GLICOCORTICOIDE DEFLAZACORTE  
PARA USO PULMONAR

LUCAS ALMEIDA RIGO

PORTO ALEGRE, 2015.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Processo de obtenção de sistemas poliméricos nanoestruturados e avaliação *in vitro* da associação entre nanocápsulas poliméricas e o glicocorticoide deflazacorte para uso pulmonar

Tese apresentada por **Lucas Almeida Rigo**  
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em  
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Ruy Carlos Ruver Beck

Porto Alegre, 2015

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 23.03.2015, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Cristiane de Bona da Silva

Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Simone Gonçalves Cardoso

Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Solange Cristina Garcia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Almeida Rigo, Lucas

Processo de obtenção de sistemas poliméricos nanoestruturados e avaliação in vitro da associação entre nanocápsulas poliméricas e o glicocorticoide deflazacorte para uso pulmonar / Lucas Almeida Rigo. -- 2015.

187 f.

Orientador: Ruy Carlos Ruver Beck.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Nanotecnologia. 2. Deflazacorte. 3. Citotoxicidade. 4. Células pulmonares. 5. Nanocápsulas poliméricas. I. Carlos Ruver Beck, Ruy, orient. II. Título.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ruy Beck, por todas as oportunidades de trabalho com pesquisa científica, desde o mestrado acadêmico até o doutorado. Pela confiança, excelente orientação, conhecimentos transmitidos e exemplo profissional.

À Profa. Dra. Sílvia S. Guterres e Profa. Dra. Adriana R. Pohlmann, pelas oportunidades concedidas ao longo do doutorado, pelas discussões científicas e atenção disponibilizada.

Ao Prof. Dr. Claus-Michael Lehr, Dra. Cristiane Carvalho e Dra. Nicole Daum-Schneider, pela supervisão e atenção disponibilizada durante meu doutorado sanduíche na *Universität des Saarlandes*.

Agradecimento especial ao grande Prof. Dr. Ulrich Schaeffer e sua esposa.

Às grandes amizades feitas e os colegas de doutorado na Alemanha: Marius Hittinger, José David-Gómez, Clemens Tcheke, Ana Kühn, Sandra Sapich, Chrissi Mathes, Afra Torge, Julia Susenwind, Maike Windbergs, Emad Seefahrt, Birthe Kann, Sarina Schwlainer, Jenny Junkte, Petra König, Simon Rã, Florian Gräf e Nicolas Alcaraz.

À Universidade Federal do Rio grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), pela excelente estrutura.

Ao corpo docente do PPGCF, pela dedicação e conhecimento transmitido.

Aos técnicos administrativos e todos os funcionários da Faculdade de Farmácia da UFRGS, pela dedicação e ajuda.

Às agências de fomento CAPES, DAAD, CNPq e Fapergs, pelo apoio financeiro.

À minha família, por acreditar em mim.

À Sara, que esteve sempre ao meu lado e foi capaz de compreender meus momentos de ausência. Muito obrigado pelo apoio, incentivo, carinho, ajuda e amizade.

Aos meus amigos do laboratório 405 e K204, por toda a ajuda, discussões científicas e apoio durante a realização desse trabalho.

Em especial aos queridos amigos Márcia Fontana, Diego Andrade, Karine Coradini, Denise Jornada, Frantiescoli Dimer, Rossana Friedrich, Karina Paese, Lali Zancan, Cecília Michalowski, Paula Chaves, Aline Ourique, Jaison Machado, Felipe D'Avila e Ricardo Lorenzoni. Sem vocês seria impossível a realização desse trabalho.

Especialmente ao grande amigo Manoel Ortiz, pela amizade, discussões científicas e trabalhos realizados durante esse período.

## APRESENTAÇÃO

Esta tese encontra-se dividida em três capítulos, visando a uma melhor organização e apresentação dos resultados, organizada da seguinte maneira:

- ❖ Introdução;
- ❖ Objetivos;
- ❖ Capítulo 1: Capítulo de livro sobre os benefícios para a saúde e aplicações em formulações farmacêuticas do óleo e arroz;
- ❖ Capítulo 2: Relatório descritivo de invenção sobre um novo processo de obtenção de nanocápsulas poliméricas utilizando homogeneização à alta pressão;
- ❖ Capítulo 3: Artigo a ser submetido a periódico científico, cujo tema aborda a avaliação *in vitro* da citotoxicidade de nanocápsulas poliméricas e o efeito da nanoencapsulação de um glicocorticoide sobre a barreira epitelial e secreção de um mediador pró-inflamatório em modelos de células pulmonares;
- ❖ Capítulo 4: Artigo a ser submetido a periódico científico, o qual discorre sobre o desenvolvimento de pós secos por aspensão a partir de uma suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo deflazacorte para uso pulmonar;
- ❖ Discussão geral;
- ❖ Conclusões;
- ❖ Referências;
- ❖ Anexo.



## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	15
OBJETIVOS.....	23
CAPÍTULO 1: Capítulo de livro " <i>Rice bran oil: benefits and applications in pharmaceutical formulations</i> ".....	27
CAPÍTULO 2: Desenvolvimento de um processo de obtenção de nanopartículas poliméricas via homogeneização à alta pressão.....	43
Revisão do tema.....	45
Depósito de pedido de patente.....	82
CAPÍTULO 3: Avaliação <i>in vitro</i> da citotoxicidade de nanocápsulas poliméricas e do efeito da nanoencapsulação de um glicocorticoide em células pulmonares.....	83
Revisão do tema.....	85
Manuscrito: <i>Nanoencapsulation of a glucocorticoid increases its effect on the epithelial barrier and decreases IL-8 secretion in vitro in Calu-3 cell line</i> .....	91
CAPÍTULO 4: Desenvolvimento de produtos secos por aspersão a partir de uma suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo um glicocorticoide para uso pulmonar.....	125
Revisão do tema.....	127
Manuscrito: <i>Dry powders inhalers containing deflazacort loaded-polymeric nanocapsules for pulmonary therapy: in vitro aerodynamic properties</i> .....	135
DISCUSSÃO GERAL.....	159
CONCLUSÕES.....	165
REFERÊNCIAS.....	169
ANEXO: Validação de método analítico para doseamento de deflazacorte em suspensão de nanocápsulas poliméricas e produtos secos por aspersão.....	179



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

#### *Relatório de pedido de patente*

- Figura 1. Processo de obtenção de nanopartículas poliméricas pelo método de polimerização em emulsão: a) adição do monômero da fase aquosa ácida sob agitação; b) neutralização e filtração da suspensão..... 53
- Figura 2. Processo de obtenção de nanopartículas poliméricas pelo método da nanoprecipitação: a) Preparação das fases orgânica e aquosa; b) Injeção da fase orgânica na fase aquosa; c) Remoção do solvente à pressão reduzida..... 54
- Figura 3. Processo de obtenção de nanopartículas poliméricas através do método da emulsificação-difusão: a) preparação das fases orgânica e aquosa; b) emulsificação; c) processo de diluição; d) remoção do solvente orgânico à pressão reduzida..... 55
- Figura 4. Processo de obtenção de nanopartículas lipídicas: a) preparação das fases orgânica (lipídica) e aquosa; b) emulsificação das fases com dispersor de alto rendimento e formação das nanopartículas lipídicas; c) processo de homogeneização da emulsão através de homogeneização à alta-pressão..... 57
- Figura 5. Processo de obtenção de suspensão de nanopartículas poliméricas via homogeneização à alta pressão: a) preparação das fases orgânica e aquosa; b) formação da emulsão primária; c) processo de homogeneização à alta-pressão; d) processo de diluição; e) remoção do solvente orgânico à pressão reduzida..... 68
- Figura 6. Distribuição granulométrica da emulsão primária..... 75
- Figura 7. Distribuição granulométrica da emulsão primária após o processo de homogeneização à alta pressão..... 75
- Figura 8. Distribuição granulométrica após etapa de diluição..... 76
- Figura 9. Distribuição granulométrica após etapa de remoção do solvente orgânico e parte da água..... 76
- Figura 10. Distribuição granulométrica de nanopartículas poliméricas pelo método de nanoprecipitação..... 77

## CAPÍTULO 3

### *Revisão do tema*

Figura 1. Representação da estrutura química do fármaco deflazacorte..... 86

### *Manuscrito*

Figure 1: Size distribution profiles by laser diffraction considering the particle volume for polymeric nanocapsules (NC), polymeric nanocapsules dispersed in Minimum Essential Medium (MEM) (NC-MEM), polymeric nanocapsules dispersed in Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) (NC-RPMI) and polymeric nanocapsules containing deflazacort (NC-DFZ)..... 105

Figure 2: Cell viability by lactate dehydrogenase (LDH) method of the (A) A549 and (B) Calu-3 cell lines exposed to polymeric nanocapsules at different particle concentrations after 2, 24 and 48 h..... 108

Figure 3: Cell viability by Alamar Blue (AB) method of the (A) A549 and (B) Calu-3 cell lines exposed to polymeric nanocapsules at different particle concentrations after 2, 24 and 48 h..... 109

Figure 4: Cell viability by lactate dehydrogenase (LDH) method of the (A) A549 and (B) Calu-3 cell lines exposed to polymeric nanocapsules at different particle concentrations after 2, 24 and 48 h..... 110

Figure 5: Cell viability by Alamar blue (AB) method of the (A) A549 and (B) Calu-3 cell lines exposed to polysorbate 80 at different concentrations after 2, 24 and 48 h..... 111

Figure 6: Transepithelial electrical resistance (TER) measurements of the Calu-3 cells after exposure to polymeric nanocapsules (NC), polymeric nanocapsules containing deflazacort (NC-DFZ) and non-encapsulated form of deflazacort (Free-DFZ). Cell culture medium (CCM) was used as control..... 112

Figure 7: Apparent permeability coefficients ( $P_{app}$ ) of sodium fluorescein after 24 h of exposure to polymeric nanocapsules (NC), polymeric nanocapsules containing deflazacort (NC-DFZ) and non-encapsulated form of deflazacort (Free-DFZ) in Calu-3 cell lines. Cell culture medium (CCM) was used as control..... 113

Figure 8: Levels of IL-8 cytokine after 24 and 48 h from (A) non-stimulated (-LPS) or (B) stimulated LPS (+LPS) of exposure to polymeric nanocapsules (NC), polymeric nanocapsules containing deflazacort (NC-DFZ) and non-encapsulated form of deflazacort (DFZ) in Calu-3 cell. Cell culture medium (CCM) was used as control..... 115

Figure 9: <i>In vitro</i> drug release/diffusion profiles of non-encapsulated deflazacort in an ethanolic solution (DFZ-ES) and from polymeric nanocapsules (NC-DFZ).....	116
---	-----

## CAPÍTULO 4

### *Manuscrito*

Figure 1: Granulometric distributions of (A) polymeric nanocapsules (NC) and (B) polymeric nanocapsules containing deflazacort (NC-DFZ).....	145
--	-----

Figure 2: Recovery of polymeric nanocapsules from DPI evaluated by laser diffraction: (A) dry powder inhaler obtained from polymeric nanocapsules (NC) suspension containing deflazacort (DFZ) with leucine at 5% (NC-DFZ-LEU5) an (B) dry powder inhaler obtained from polymeric nanocapsules (NC) suspension containing deflazacort (DFZ) with lactose at 5% (NC-DFZ-LAC10)	148
---	-----

Figure 3: Scanning electron microscopy images of (A) dry powder inhaler obtained from polymeric nanocapsules (NC) suspension containing deflazacort (DFZ) with leucine at 5% (NC-DFZ-LEU5) and (B) dry powder inhaler obtained from polymeric nanocapsules (NC) suspension containing deflazacort (DFZ) with lactose at 5% (NC-DFZ-LAC10).....	150
--	-----

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

#### *Depósito de pedido de patente*

Tabela 1. Distribuição do tamanho de partícula correspondente a 10, 50 e 90% da população das partículas das formulações NCH-PCL-OA e NC-PCL-OA.....	77
--	----

### CAPÍTULO 3

#### *Manuscrito*

Table 1: Particle size distribution by laser diffraction spectroscopy (LDS) of polymeric nanocapsules.....	106
Table 2. Physicochemical characteristics of polymeric nanocapsules obtained by photon correlation spectroscopy (PCS).....	106

### CAPÍTULO 4

#### *Manuscrito*

Table 1. Mean particle sizes of polymeric nanocapsules (NC) suspension and polymeric nanocapsules suspension containing deflazacort (NC-DFZ) measured by two different techniques. Results represent mean measurements for three batches ( $\pm$ SD).....	146
---	-----

## RESUMO

A busca por tratamentos mais eficazes é um dos principais fatores motivadores para novas pesquisas farmacêuticas, sustentando o uso da nanotecnologia. Os medicamentos de base nanotecnológica ainda não atingiram de forma ampla o mercado farmacêutico, pois alguns obstáculos como, por exemplo, os métodos de preparação limitam sua produção em maior escala. A nanotecnologia também tem sido aplicada para a via pulmonar, cujo uso de anti-inflamatórios glicocorticoides é indispensável na terapêutica dessa via. Nesse contexto, este estudo apresenta um novo método de obtenção de uma suspensão nanoestruturada e a avaliação *in vitro* de nanocápsulas poliméricas de deflazacorte visando o uso pulmonar. A primeira etapa experimental demonstrou a produção de uma suspensão de nanopartículas poliméricas utilizando a homogeneização à alta pressão, cujo processo resultou em uma formulação com características nanotecnológicas adequadas e com grande potencial de aplicação em diversas áreas do conhecimento. Em um segundo momento a associação entre nanocápsulas poliméricas e o deflazacorte foi avaliada em modelos *in vitro* de células pulmonares. Um estudo nanotoxicológico em que o número de partículas foi utilizado como parâmetro de dose demonstrou que a concentração de  $9.85E+11$  partículas por mililitros apresentou baixa toxicidade em células pulmonares. Na sequência foi observado que o efeito da nanoencapsulação do fármaco aumentou a integridade da barreira epitelial e diminuiu a permeação paracelular em células bronquiais. Além disso, essa suspensão diminuiu os níveis de interleucina-8 após 48 horas. A terceira etapa deste trabalho demonstrou o desenvolvimento de uma forma farmacêutica pulverulenta através da técnica de secagem por aspersão a partir da suspensão de nanocápsulas de deflazacorte. O pó desenvolvido com o adjuvante de secagem leucina na concentração de 5% apresentou diâmetro aerodinâmico e capacidade de aerossolização adequados. Desta forma, essa formulação pode ser sugerida como método alternativo de administração do deflazacorte para a via pulmonar por inalação.

**Palavras-chave:** Citotoxicidade, células pulmonares, deflazacorte, glicocorticoide, pulmonar, nanotecnologia, nanocápsulas poliméricas, via pulmonar.

## ABSTRACT

The search for more effective treatments is one of the main exciting factors for novel pharmaceutical research, supporting the use of nanotechnology. Nanotechnology-based drugs have not yet reached broadly the pharmaceutical market, because some drawbacks, for example, the preparation methods limit their industrial production. Nanotechnology has been also applied for the pulmonary route, being the use of the glucocorticoids considered essential in the lung therapy. In this context, this study presents a new preparation method of a nanostructured suspension and the *in vitro* evaluation of deflazacort-based polymeric nanocapsules aiming the pulmonary administration. The first step of this thesis demonstrated the production of a polymeric nanoparticles suspension using high pressure homogenization, whose process resulted in a formulation with adequate nanotechnological characteristics and great potential of application in several areas of the knowledge. The second part of this work evaluated the association between polymeric nanocapsules and deflazacort in *in vitro* lung cell models. Nanotoxicology evaluation where the number of particles was used as dosage parameter presented low cytotoxicity for the concentration of  $9.85 \times 10^{11}$  particles per ml in different lung cell models. Moreover, it was observed that the nanoencapsulation increased the epithelial barrier integrity and decreased paracellular permeation in bronchial cells. In addition, this suspension decreased the levels of interleukin-8 after 48 hours of exposure. The last step of this work showed the development of a dry powder inhaler using spray-drying technique from a deflazacort-based polymeric nanocapsules suspension. The powder developed using leucine as drying adjuvant at 5% presented suitable aerodynamic diameter and elevated aerosolization efficiency. Thus, this formulation could be suggested as an alternative method for the lung administration of this glucocorticoid by inhalation.

**Keywords:** Cytotoxicity, deflazacort, glucocorticoid, lung cell, nanotechnology, polymeric nanocapsules pulmonary.







O desenvolvimento de nanopartículas poliméricas tem contribuído de forma expressiva para a proposição e estudo de formas farmacêuticas inovadoras, cujos benefícios têm proporcionado outra perspectiva para a aplicação de fármacos de diversas classes terapêuticas. O controle do perfil da liberação de fármacos, o aumento da estabilidade de substâncias ativas, além da possibilidade de melhorar seus efeitos terapêuticos ilustram algumas vantagens farmacotécnicas que tornam superior o desempenho das formulações farmacêuticas de base nanotecnológica em comparação com as formas farmacêuticas clássicas (Marcato e Duran, 2008; Bernardi *et al.*, 2009; Fontana *et al.*, 2010; Kumari *et al.*, 2010; Benvegnu *et al.*, 2011).

As nanocápsulas poliméricas - formulações nanoestruturadas amplamente estudadas na área farmacêutica - configuram-se como sistemas "reservatórios" que apresentam, na maioria dos casos, um núcleo de caráter lipídico encerrado por uma membrana polimérica. Além das características citadas, esses sistemas destacam-se pela alta eficiência de encapsulação de fármacos lipofílicos bem como a proteção dos mesmos frente à degradação fotoquímica (Mora-Huertas *et al.*, 2010). Além disso, o uso de polímeros biodegradáveis para a preparação de tais partículas é preferível, o que possibilita o seu uso em diversas vias de administração, incluindo a via intravenosa (Zhang *et al.*, 2008).

Existem diversos tipos de óleos que podem ser utilizados na preparação de nanocápsulas poliméricas como sintéticos (óleo mineral) semissintéticos (triglicerídeos de cadeia média) e de origem vegetal. As nanocápsulas poliméricas preparadas com triglicerídeos de cadeia média geralmente apresentam uma alta taxa de encapsulação de fármacos lipofílicos; por esse motivo, esse óleo é amplamente utilizado na preparação desse tipo de partícula (Mora-Huertas *et al.*, 2010). Os óleos vegetais, como por exemplo, óleo de soja, óleo de sementes de uva e óleo de girassol estão sendo cada vez mais utilizados na preparação de sistemas nanoestruturados. O recente uso desse tipo de óleo não se limita somente a encapsular fármacos, mas também por apresentarem em sua composição altas concentrações de compostos fitoquímicos de grande relevância para a saúde como

triacilgliceróis de cadeia insaturada e substâncias antioxidantes (Friedrich *et al.*, 2008; Almeida *et al.*, 2010; Rigo *et al.*, 2014; Rigo *et al.*, 2015).

Entre os óleos vegetais, o óleo de arroz destaca-se por ser rico em antioxidantes naturais tais como tocoferóis, tocotrienos e, especialmente, o  $\gamma$ -orizanol.  $\gamma$ -orizanol é um eficiente composto antioxidante e tem sido utilizado para preparação de diversas formas farmacêuticas (Juliano *et al.*, 2005; Rigo *et al.*, 2010; Rigo *et al.*, 2015). Além disso, esse composto pode ser encontrado somente nesse tipo de óleo vegetal. Nesse sentido, o primeiro capítulo desta tese de doutorado apresentada, na forma de um capítulo de livro, como esse óleo vegetal é obtido, os seus benefícios para a saúde bem como suas principais aplicações no âmbito farmacêutico.

Os métodos comumente utilizados para a preparação desse tipo de partícula são a deposição interfacial do polímero pré-formado (ou nanoprecipitação) e a emulsificação-difusão (Vauthier e Bouchemal, 2009; Kumari *et al.*, 2010; Mora-Huertas *et al.*, 2010). Embora diversos trabalhos demonstrem uma miríade de possibilidades de aplicação, as nanocápsulas poliméricas ainda não alcançaram efetivamente o mercado farmacêutico, apesar de seu emprego no mercado cosmético. Porém, é possível encontrar alguns argumentos na literatura científica que justificam esse fato. Hafner e colaboradores destacam que os parâmetros de controle de qualidade, a separação de produtos ou subestruturas resultantes dos métodos de obtenção e os problemas de transposição da escala laboratorial para a industrial dessas formulações são alguns dos fatores que limitam a abrangência de tais produtos no mercado farmacêutico (Hafner *et al.*, 2014). Em um recente artigo de revisão, Dimer e colaboradores (2013) destacam que existem poucos produtos no mercado em comercialização contendo nanopartículas poliméricas, sendo esses manufaturados em países cujo aporte financeiro destinado à nanociência é superior ao padrão brasileiro. No âmbito nacional, os autores enfatizam que a falta de cultura de proteção da produção intelectual por parte dos pesquisadores e uma maior interação indústria-universidade ainda são alguns dos obstáculos a serem superados (Dimer *et al.*, 2013). Um exemplo exitoso dessa interação é o fotoprotetor Fotoprot<sup>®</sup>, cujo produto que contém nanopartículas poliméricas é resultado de uma

parceria entre uma empresa farmacêutica do setor privado e o grupo de pesquisa Sistemas Nanoestruturados para Administração de Fármacos (SNAF), vinculado à Faculdade de Farmácia da UFRGS. Além disso, as políticas de Ciências e Tecnologia ultimamente implantadas no país têm contribuído para mudar o cenário nacional, por meio de incentivo financeiro para esse setor, bem como listando a nanotecnologia como uma das áreas prioritárias de pesquisa e desenvolvimento. Assim, faz-se necessário que as atenções se voltem ao desenvolvimento de novos métodos/processos de produção que possibilitem a produção dessas formulações que atendam às demandas, visando à ampliação da perspectiva de entrada desses produtos no mercado farmacêutico.

Conforme mencionado anteriormente, a aplicação de sistemas nanoestruturados na terapêutica é, de fato, bastante promissora. Antes de ser lançado no mercado, qualquer produto farmacêutico que agregue uma nova tecnologia deve ser submetido a uma avaliação criteriosa, especialmente sobre sua eficácia e segurança. O crescente interesse no desenvolvimento de produtos de base nanotecnológica não só na área farmacêutica, mas também nas diversas áreas do conhecimento, tem gerado intenso debate, especialmente no que tange os possíveis riscos que tais produtos podem gerar ao meio ambiente e à saúde humana (Oberdorster *et al.*, 2005; Paschoalino *et al.*, 2010). Por se tratar de uma ciência recente, a nanotecnologia ainda não dispõe de paradigmas que norteie testes ou que estabeleça critérios de avaliação sobre as possíveis complicações que esses produtos podem causar. Diante dessas circunstâncias, uma abordagem caso a caso desses produtos é necessária (Linkov *et al.*, 2008).

Nesse contexto, a nanotoxicologia, cujo termo foi cunhado por Donaldson e colaboradores em meados da última década, se propõe a estudar os possíveis efeitos deletérios resultantes da interação entre nanopartículas e sistemas biológicos, incluindo células, tecidos e seres vivos (Donaldson *et al.*, 2004). Uma das principais razões que motivam os pesquisadores a se dedicarem a essa disciplina é o fato desses sistemas apresentarem superfície de contato muito grande em relação ao seu volume. No entanto, passa a existir uma situação conflitante: a característica que torna os sistemas nanoestruturados interessantes do ponto de vista da

tecnologia farmacêutica é a mesma que pode limitar sua aplicação. Além disso, outras características como carga de superfície, forma, a presença de contaminantes, o uso de solventes durante sua preparação e a diversidade de matérias primas que podem ser utilizados para a fabricação de nanopartículas também são objetos de pesquisa na nanotoxicologia (Oberdorster *et al.*, 2005; Verma e Stellacci, 2010; Elsaesser e Howard, 2012).

Atualmente existem diversos modelos disponíveis para avaliar os efeitos tóxicos de nanopartículas, cujos protocolos abrangem tanto estudos *in vitro* quanto *in vivo*. Porém, a partir dos modelos *in vitro* é possível utilizar diversos tipos de células oriundas de diferentes tecidos, como por exemplo, linhagens celulares oriundas do sistema respiratório ou digestório (Forbes e Ehrhardt, 2005; Beck *et al.*, 2007). É evidente que estudos *in vitro* não substituem os testes realizados *in vivo*. Entretanto, a partir destes é possível presumir alguns resultados esperados com precisão e em um curto espaço de tempo. Assim, os protocolos *in vitro* configuram-se como uma ferramenta de rastreio (*screening*). Outras vantagens em se utilizar esses modelos em estudos nanotoxicológicos incluem a ausência de interferências de origem natural (por exemplo, processos inflamatórios, flutuações hormonais) e/ou de fatores de compensação fisiológicos que podem confundir a interpretação dos resultados. Adicionalmente, a redução do uso indiscriminado de animais para fins de pesquisa é outro fator que contribui para o uso dos modelos *in vitro* (Hartung e Daston, 2009; Oberdorster, 2010; Arora *et al.*, 2012).

Uma das principais rotas de exposição para a entrada de agentes externos, incluindo nanopartículas, é a via respiratória (Ferreira *et al.*, 2013). Ao mesmo tempo, essa via também serve como rota alternativa para administração de fármacos. A via pulmonar torna-se interessante para tal fim por ser minimamente invasiva e também por apresentar grande superfície de absorção. Outro aspecto a ser considerado da via pulmonar é a possibilidade de evitar o metabolismo de primeira passagem hepático, cujos efeitos são inevitáveis quando a via oral é eleita para administração de fármacos. Assim, a partir da combinação dessas características e as vantagens tecnológicas das nanopartículas poliméricas, a via pulmonar tem sido estudada como uma plataforma tecnológica para a administração

de fármacos associados a sistemas nanoestruturados. (Azarmi *et al.*, 2008; Thorley e Tetley, 2013).

Com relação aos aspectos físico-químicos das formulações farmacêuticas contendo nanocápsulas poliméricas, tais produtos farmacêuticos são geralmente obtidos na forma de suspensões aquosas, sendo passíveis de fenômenos físicos e/ou químicos de instabilidade. Alguns fenômenos físicos que podem ocorrer nessas suspensões são a migração de partículas (cremagem, sedimentação) e/ou a fusão de uma ou mais partículas (floculação, coalescência). Os fenômenos químicos de instabilidade, por sua vez, são aqueles decorrentes da degradação de matérias-primas (especialmente polímeros) devido à grande superfície de contato que as partículas têm com o meio aquoso. Como consequência, podem ocorrer alterações do pH da suspensão e o favorecimento do desenvolvimento de microrganismos. A ocorrência desses fenômenos faz com que o tempo de armazenamento e a funcionalidade dessas suspensões sejam limitados (Schaffazick *et al.*, 2003). Com a finalidade de minimizar esses fenômenos de instabilidade, técnicas de secagem como a liofilização e a secagem por aspersão viabilizam o processo de transição do estado líquido da formulação para o estado sólido.

Considerando as potencialidades de aplicação das nanocápsulas poliméricas na terapêutica e os métodos atuais de produção desse tipo de nanopartícula, a presente tese propõe um novo processo de obtenção de suspensão de nanocápsulas poliméricas através do uso do método de emulsificação-difusão acoplado à homogeneização à alta pressão. Em seguida, o segundo capítulo demonstra um estudo *in vitro* avaliando a citotoxicidade de uma suspensão de nanocápsulas poliméricas em células pulmonares, bem como os efeitos da nanoencapsulação do fármaco deflazacorte sobre a barreira epitelial e o controle de secreção de interleucina-8 nestas células. Por fim, baseado nos princípios de obtenção de formas farmacêuticas sólidas a partir de suspensões nanoestruturadas, o terceiro capítulo dedica-se ao desenvolvimento de pós secos por aspersão contendo as nanocápsulas poliméricas de deflazacorte desenvolvidas no capítulo anterior, visando a sua administração pela via pulmonar.



**OBJETIVOS**

---



## Objetivo geral

Desenvolver um processo inédito de obtenção de uma suspensão de nanocápsulas poliméricas empregando o método de emulsificação-difusão acoplado a homogeneização à alta pressão, considerando as características da escala nanométrica. Esse trabalho também objetiva avaliar *in vitro* a citotoxicidade e o efeito de nanoencapsulação de um glicocorticoide (deflazacorte) em células pulmonares, bem como o desenvolvimento de uma forma farmacêutica pulverulenta para uso pulmonar a partir dessa suspensão.

## Objetivos específicos

- ❖ Desenvolver um processo inédito de preparação de uma suspensão de nanopartículas poliméricas utilizando do método de emulsificação-difusão seguido da homogeneização à alta pressão que apresente características nanotecnológicas adequadas;
- ❖ Desenvolver uma formulação de nanocápsulas poliméricas contendo deflazacorte e avaliar *in vitro* a citotoxicidade dessa suspensão em células representativas das porções alveolares (A549) e bronquiais (Calu-3) do sistema respiratório;
- ❖ Estudar a influência da nanoencapsulação do fármaco sobre a barreira epitelial e secreção de um mediador pró-inflamatório em células Calu-3;
- ❖ Desenvolver uma forma farmacêutica pulverulenta a partir dessa suspensão de nanocápsulas utilizando a técnica de secagem por aspersão e avaliar a influência de dois tipos de adjuvantes de secagem nas propriedades aerodinâmicas



**CAPÍTULO 1:** Rice bran oil: benefits to health and applications in pharmaceutical formulations

---



O conteúdo presente no Capítulo 1 desta tese de doutorado refere-se ao Capítulo 23 do livro *“Wheat and Rice in Disease Prevention and Health”*, publicado pela editora Elsevier® no ano de 2014, motivo pelo qual foi excluído da versão digital disponibilizada para a Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da UFRGS.



























**CAPÍTULO 2:** Desenvolvimento de um processo de obtenção de nanopartículas  
poliméricas via homogeneização à alta pressão

---



## Revisão do tema

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos ou outras substâncias de interesse cujo diâmetro particular é inferior a 1  $\mu\text{m}$  (cerca de 10 - 1000 nm). Atualmente existem diversos tipos de nanoestruturas amplamente utilizadas para diferentes propósitos no contexto das ciências farmacêuticas, seja para carrear fármacos ou substâncias de uso cosmético. (Soppimath *et al.*, 2001; Kumari *et al.*, 2010; Mora-Huertas *et al.*, 2010). Conforme a literatura científica, entre os sistemas nanoestruturados amplamente estudados no campo farmacêutico, as nanocápsulas poliméricas destacam-se devido seu grande potencial de aplicação como um sistema nanocarreador de fármacos (Friedrich *et al.*, 2008; Fontana *et al.*, 2009; Fontana *et al.*, 2010; Rigo *et al.*, 2014)

Os métodos amplamente utilizados para a obtenção dessas nanopartículas são a deposição interfacial do polímero pré-formado (ou nanoprecipitação) e emulsificação-difusão (Soppimath *et al.*, 2001). O método da deposição interfacial do polímero pré-formado, primeiramente descrito por Fessi e colaboradores em 1988, parte do preparo de uma fase orgânica e outra aquosa (Fessi *et al.*, 1988). A fase orgânica é composta por solvente orgânico miscível em água (geralmente acetona, etanol ou mistura de solventes) onde o polímero, óleo e eventualmente um fármaco são solubilizados. Em seguida, essa fase é injetada em uma fase aquosa, que é composta por um ou uma combinação de tensoativos. Através desse método, a presença de um lipídio líquido na fase orgânica leva a formação de nanocápsulas (sistemas vesiculares) ao passo que a ausência do mesmo origina a formação de nanoesferas (sistemas matriciais) (Schaffazick *et al.*, 2003). Já a partir da combinação de um lipídio líquido e um lipídio sólido é possível obter estruturas similares, denominadas de nanocápsulas de núcleo lipídico (Venturini *et al.*, 2011).

A emulsificação-difusão é outro método empregado na preparação de nanocápsulas poliméricas, proposto por Quintanar-Guerreiro e colaboradores em 1998 (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998). Esse método difere do anterior principalmente por utilizar solvente orgânico parcialmente miscível em água. Essa particularidade é requisito imprescindível durante o processo de preparação, pois é

necessário que exista um equilíbrio termodinâmico entre as fases orgânica e aquosa durante o processo de emulsificação. Para tanto, ambos os solventes devem ser saturados previamente à preparação das fases. O manuscrito de 1998 descreve a fase orgânica composta por um solvente orgânico (acetato de etila) saturado em água, polímero (poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), poli(D,L-ácido láctico) (PLA) ou Eudragit E. Os autores avaliaram ainda a viabilidade de uso de dois óleos: triglicerídeos de cadeia média e óleo mineral. A fase aquosa foi composta por água previamente saturada no solvente orgânico e um tensoativo hidrofílico (poli(vinil álcool)), sendo o processo de emulsificação das fases realizado através do uso de um dispersor de alto rendimento (Ultraturrax<sup>®</sup>) a 8000 rpm por 10 minutos. Na sequência, deu-se a etapa de diluição, onde uma quantidade de água foi adicionada ao sistema e, finalmente, o solvente orgânico e parte da água foram removidos com o uso de um evaporador rotatório. É válido ressaltar que o tensoativo hidrofílico utilizado nesse trabalho é potencialmente tóxico, havendo necessidade de purificação.

Esses métodos são amplamente utilizados para a obtenção de nanocápsulas poliméricas, pois apresentam vantagens como facilidade de produção e alta eficiência de encapsulamento de fármacos. Outros fatores que concorrem para o sucesso desses métodos na preparação de tais partículas são o uso de solventes de baixa ou nenhuma toxicidade e materiais poliméricos biodegradáveis. É importante ressaltar que ambos os métodos requerem a mistura de duas fases (aquosa e orgânica) a fim de favorecer a difusão do solvente orgânico para a fase externa (Mora-Huertas *et al.*, 2012).

O processo de formação das nanocápsulas poliméricas pelo método de nanoprecipitação acontece em uma etapa, precisamente no momento em que a fase orgânica é injetada na fase aquosa. Essa formação é instantânea, em função da rápida difusão do solvente orgânico para a fase aquosa, cuja estruturação ocorre em uma zona de turbulência entre essas fases no momento da injeção. Essa turbulência pode ser provocada no sistema, por exemplo, por agitação magnética ou por sonicação (Mora-Huertas *et al.*, 2011). Alguns fatores como carga polimérica e a proporção dos componentes da formulação podem provocar alterações em algumas características físico-químicas importantes da suspensão tais como o tamanho

médio das nanopartículas, potencial zeta e também na formação de outras estruturas além de nanocápsulas poliméricas (Venturini *et al.*, 2011). Por outro lado, o processo de formação de nanocápsulas poliméricas pelo método de emulsificação-difusão compreende duas etapas: emulsificação e diluição. A primeira etapa é aquela onde há a emulsificação das fases orgânica e aquosa com a subsequente formação de estruturas de tamanho submicrométrico; porém, ainda não há a estruturação propriamente dita das nanocápsulas. Como os solventes ainda estão em equilíbrio termodinâmico, nessa etapa há a formação de gotículas compostas por polímero, solvente e eventualmente o fármaco, estabilizadas pelo tensoativo hidrofílico. Assim, a etapa de diluição é fundamental nesse processo, pois a adição de água provoca o desequilíbrio termodinâmico entre as fases fazendo com que o solvente orgânico difunda para a fase contínua. Por consequência disso, o polímero deposita-se em torno dessas gotículas, estruturando assim as nanocápsulas (Moinard-Chécot *et al.*, 2008).

No método de emulsificação-difusão, a etapa de emulsificação resulta em gotículas nanométricas sendo possível o controle do tamanho de partícula através do ajuste da velocidade da taxa de cisalhamento no momento da homogeneização. Os equipamentos comumente utilizados nessa etapa são agitadores mecânicos, sonificadores ou homogeneizadores de alto rendimento. Nesse aspecto, o método de emulsificação-difusão permite utilizar equipamentos com maior poder cisalhante para a emulsificação, ao passo que no método da nanoprecipitação geralmente utiliza-se agitação por pequenas barras magnéticas (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998; Mora-Huertas *et al.*, 2011).

Alguns trabalhos na literatura demonstram o uso da homogeneização à alta pressão no processo de obtenção de nanopartículas poliméricas pelo método da emulsificação-evaporação do solvente. Jaiswal e colaboradores (2004) desenvolveram nanopartículas poliméricas de ciclosporina com o intuito de diminuir a toxicidade de uma microemulsão comercializada no mercado (Sandimmun<sup>TM</sup>, Novartis<sup>®</sup>). Para tanto, os pesquisadores avaliaram os copolímeros *Poli*(DL-ácido láctico-co-ácido glicólico) (DL-PLG) 50/50 e 65/53 e PEG- DLPLG 5000/70:30. A fase orgânica foi composta pelos copolímeros que foram solubilizados em

diclorometano através de agitação magnética e 50 mg de ciclosporina. Em seguida essa fase foi pré-emulsionada em água contendo um tensoativo (álcool polivinil) com a ajuda de Ultraturrax<sup>®</sup> por dois minutos a 13000 rpm. Essa pré-emulsão foi submetida a um homogeneizador à alta-pressão por quatro ciclos a 500 bar e a suspensão resultante mantida por 24 horas sob agitação magnética a 300 rpm a fim de eliminar o solvente orgânico. Além disso, as suspensões foram submetidas a processo de secagem por liofilização. Análises de tamanho revelaram que após esse processo as partículas apresentaram tamanho médio de partícula em torno de 200 nm e baixo índice de polidispersão (Jaiswal *et al.*, 2004). Dong e Feng (2007) também utilizaram a homogeneização à alta-pressão para desenvolver nanopartículas do polímero biodegradável poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA) a fim de controlar a liberação do fármaco quimioterápico paclitaxel através do mesmo método utilizado no trabalho citado anteriormente. A fase orgânica foi constituída por PLGA e fármaco, ambos solubilizados em diclorometano. Após, essa fase foi emulsionada em água contendo PVA, resultando em uma pré-emulsão. Então essa pré-emulsão foi submetida a um equipamento de homogeneização à alta-pressão por dois e três ciclos de 860 e 1550 bar, respectivamente. Para que o solvente orgânico fosse removido, a suspensão resultante foi submetida à agitação magnética por 24 horas e uma forma pulverulenta foi obtida através de secagem por liofilização. As partículas apresentaram tamanho médio entre 240 a 300 nm com estreita faixa de distribuição granulométrica. Ao analisar esses resultados, observa-se que quanto maior o número de ciclos aos quais a suspensão é submetida, menor é o tamanho médio resultante. Porém, empregando 860 ou 1550 bar, as formulações apresentam o mesmo tamanho de partícula em cada um dos ciclos aplicados. Os autores sugerem que esse fato deve-se a baixa viscosidade da emulsão, sendo a pressão mais baixa suficiente para atingir o tamanho nanométrico ótimo dessa formulação. Por outro lado, um maior número de ciclos acarreta em uma diminuição da taxa de associação do fármaco. Em última análise, os autores observam que o uso de homogeneização à alta-pressão é uma ferramenta importante para a produção de nanopartículas poliméricas em larga escala (Dong e Feng, 2007).

Ao observarmos a organização supramolecular das nanoestruturas dos trabalhos supracitados, constata-se que se tratam, por definição, de nanoesferas e não de nanocápsulas poliméricas. Outro aspecto a ser observado nesses trabalhos citados é o método da emulsificação-evaporação do solvente, utilizado para a preparação das nanopartículas poliméricas. Esse método difere da emulsificação-difusão, pois o polímero e o princípio ativo são solubilizados em solvente volátil e miscível em água, compondo uma fase orgânica. Na sequência essa fase é emulsionada em uma fase aquosa, ou com o uso de homogeneizadores de alto rendimento ou à alta-pressão, sendo o solvente removido por aquecimento, vácuo ou temperatura ambiente.

A diversidade de sistemas nanoestruturados poliméricos existente deve-se ao avanço tecnológico e ao aprimoramento de técnicas de preparação, o que contribui para a evolução da terapêutica. No entanto, os produtos de base nanotecnológica ainda enfrentam obstáculos para atingir o mercado farmacêutico. Além dos fatores já mencionados na seção introdutória desse trabalho, o uso de equipamentos especializados, a padronização de técnicas de controle de qualidade e a pouca estabilidade das suspensões de nanopartículas também são outros desafios. Ainda, a falta de um conjunto de diretrizes/normas que norteie esses produtos contribui para essa dificuldade. Porém, isto pode estar se tornando realidade: em outubro de 2011, o órgão regulatório europeu *Official Journal of the European Union* divulgou uma recomendação definindo que um nanomaterial “deve apresentar 50% das partículas menores que 100 nm”.

Os métodos de obtenção de produtos farmacêuticos contendo nanopartículas em larga escala também é um dos fatores limitantes. O processo de escalonamento de qualquer produto farmacêutico deve atender-se especialmente em manter as características alcançadas daquelas obtidas em escala laboratorial; o tempo operacional e custo-benefício também devem ser levados em consideração (Levin, 2006). Porém, a escassez de informações e o baixo número de trabalhos dedicados a esse tema é um dos – talvez o principal - problemas que dificultam que formulações farmacêuticas de base nanotecnológica sejam comercializadas. Em um dos poucos trabalhos sobre a produção em larga escala de nanopartículas

poliméricas, Galindo-Rodriguez e colaboradores (2005) demonstraram um estudo comparativo entre três métodos de produção: *salting-out*, emulsificação-difusão e nanoprecipitação, utilizando ibuprofeno como fármaco modelo. As quantidades de matérias-primas envolvidas na produção das nanopartículas em cada método foram ajustadas para atender a proposta do trabalho em aumentar em 20 vezes a capacidade da escala laboratorial. As características das nanopartículas em escala laboratorial foram bem reproduzidas na escala piloto. Porém, o aumento na velocidade de agitação na etapa de emulsificação fez com que o tamanho médio de partícula diminuísse sistematicamente tanto no método de *salting-out* quanto no método emulsificação-difusão. No método da nanoprecipitação, os autores ressaltam que o modo contínuo de formação das partículas (injeção direta da fase orgânica na fase aquosa) permite a preparação de lotes de diferentes volumes através do ajuste de poucos parâmetros como, por exemplo, a taxa de fluxo de injeção da fase orgânica na fase aquosa (Galindo-Rodríguez *et al.*, 2005).

Considerando o potencial de aplicação das nanocápsulas poliméricas na terapêutica e as dificuldades de produção em maior escala desses sistemas, o primeiro capítulo demonstra o relatório de invenção de um processo de obtenção de uma suspensão de nanocápsulas poliméricas inédito através do método de emulsificação-difusão utilizando homogeneização à alta-pressão. Baseado em um estudo sistematizado de diversos fatores que envolvem a produção de nanopartículas por esse método, a avaliação das características físico-químicas dessas partículas obtidas demonstra a viabilidade de produção desse tipo de nanopartículas.

**Processo de obtenção de nanopartículas poliméricas utilizando  
homogeneização à alta pressão**

Depósito de pedido de patente protocolado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI)

---



O conteúdo do presente capítulo desta tese de doutorado refere-se a um material confidencial sujeito a depósito de patente, motivo pelo qual foi suprimido da versão digital disponibilizada para a Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da UFRGS.

























































## **Protocolo de depósito de pedido de patente**

**CAPÍTULO 3:** Avaliação *in vitro* da citotoxicidade de nanocápsulas poliméricas e do efeito da nanoencapsulação de um glicocorticoide em células pulmonares

---



## Revisão do tema

O advento da nanotecnologia trouxe uma nova perspectiva para o desenvolvimento de formas farmacêuticas e, por consequência, uma nova abordagem à terapia de medicamentos (Suri S *et al.*, 2007; Thorley e Tetley, 2013). As nanopartículas poliméricas, amplamente estudadas pelo nosso grupo de pesquisa, destacam-se pela versatilidade, em razão da sua alta capacidade de encapsulação de diferentes fármacos e outras substâncias com atividade terapêutica, bem como a possibilidade de aplicação por diferentes vias de administração, incluindo a via pulmonar (Schaffazick *et al.*, 2003; Azarmi *et al.*, 2008).

A via pulmonar tem sido considerada uma boa opção para administração de fármacos, tanto para uso local quanto sistêmico. A nanotecnologia farmacêutica, aliada às vantagens fisiológicas do pulmão, pode contribuir bastante para que essa via seja cada vez mais utilizada com finalidade terapêutica. Esses avanços traduzem-se no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados que contêm fármacos para o tratamento de doenças que acometem o trato respiratório como, por exemplo, fibrose cística (Cartiera *et al.*, 2009), câncer (Nafee *et al.*, 2012) e asma (Matsuo *et al.*, 2009). Geralmente essas e outras complicações da via pulmonar apresentam em seus quadros clínicos uma coleção de células inflamatórias, as quais demandam o uso de um agente anti-inflamatório. Os glicocorticoides são os fármacos de escolha para esse tipo de o tratamento no trato pulmonar, devido ao seu reconhecido efeito anti-inflamatório (Sekiyama *et al.*, 2012; Boardman *et al.*, 2014). O deflazacorte (Figura 1), pertencente a essa classe terapêutica, possui potente atividade anti-inflamatória e ação imunossupressora. Atualmente é comercializado na forma de comprimidos e suspensão oral e é indicado para o tratamento de condições inflamatórias como asma, bursite e artrite reumatoide(Gray *et al.*, 1991; Rizzato *et al.*, 1997; Ferraris *et al.*, 2007).

A associação de fármacos à nanocarreadores deve não só assegurar a eficácia terapêutica, mas também sua segurança quanto ao uso. Enquanto a nanotecnologia farmacêutica avança no campo do desenvolvimento de formulações inovadoras,

algumas questões relativas aos riscos que as nanopartículas podem causar à saúde e ao meio ambiente fazem parte de um cenário de intenso debate (Linkov *et al.*, 2008; Elsaesser e Howard, 2012).

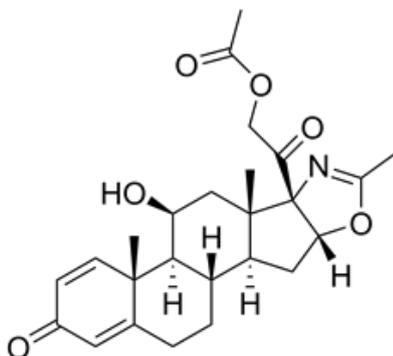


Figura 1. Representação da estrutura química do fármaco deflazacorte.

De um modo geral, a possibilidade de acúmulo de nanopartículas nos sistemas biológicos (células, tecidos e órgãos) devido ao pequeno tamanho de partícula e a diversidade de matérias-primas (polímeros sintéticos, tensoativos, metais) que podem ser utilizadas no preparo dessas formulações são os principais motivadores para a condução de estudos acerca desse assunto (Nowack e Bucheli, 2007). Assim, o conhecimento dos mecanismos subjacentes da interação entre nanopartículas e sistemas biológicos é de fundamental importância para garantir o uso seguro de sistemas nanoestruturados como produto; além disso, esses estudos são imprescindíveis para que estes sejam devidamente aprovados por órgãos regulatórios (Barrena *et al.*, 2009; Arora *et al.*, 2012).

Outro ponto de intensa discussão sobre esse assunto, especialmente dentro da nanotoxicologia pulmonar, é a métrica de dose das nanopartículas a ser considerada para expressar a resposta de efeitos tóxicos. Na toxicologia, a massa pelo volume (como por exemplo, mg/ml) é a métrica classicamente utilizada para estabelecer uma correlação entre o agente tóxico e seus efeitos. Considerando um dado sistema contendo nanopartículas em suspensão, onde o estado sólido e líquido coexistem, o

número de partículas (partículas/  $\text{cm}^{-3}$ ) e a área de superfície total ( $\text{cm}^2.\text{ml}^{-1}$ ) justificam-se como parâmetros mais adequados, pois permitem associar de maneira mais clara os efeitos tóxicos gerados a partir das interações entre nanopartículas e sistemas biológicos do que somente a massa total do(s) componente(s) das nanopartículas. Essa teoria fica mais evidente ao tomarmos como exemplo duas suspensões genéricas de nanopartículas preparadas a partir da mesma massa de matérias primas, porém com diâmetro médio de partícula diferente. Logo essas suspensões apresentam número de partícula e área de superfície de contato diferente. Assim, o resultado da interação dessas suspensões com sistemas biológicos tende a ser diferente também. Desta forma a massa total parece não ser a melhor métrica a ser utilizada para correlacionar a resposta de um sistema biológico quando em contato com certo número de nanopartículas (Oberdorster *et al.*, 2005; Wittmaack, 2007; Albanese *et al.*, 2012; Elsaesser e Howard, 2012).

Atualmente existe uma tendência em utilizar as culturas celulares para avaliar os efeitos tóxicos de nanopartículas. Isso permite a realização de um bom número de testes dentro de um curto intervalo de tempo, praticidade e, sobretudo, a redução do uso de animais (Freshney, 2006). Esse último aspecto inspira-se no princípio dos "3R" (*Replacement, Reduce and Refinement*), cuja aplicação do conceito é basilar para o bem-estar animal. A partir disso, há um consenso para que se desenvolvam novos testes *in vitro*, visando reduzir o número de animais utilizados na pesquisa (Terry *et al.*, 2011; Arora *et al.*, 2012; Schiffelers *et al.*, 2014). A aplicabilidade de modelos *in vitro* não se limita aos estudos sobre o metabolismo celular e as interações célula-fármaco, mas permitem também avaliar aspectos toxicológicos de produtos farmacêuticos, bem como a conjuntura dos mecanismos que regulam a absorção e o transporte celular (Forbes e Ehrhardt, 2005; Grainger *et al.*, 2006).

Algumas linhagens celulares do trato respiratório são capazes de reproduzir *in vitro* propriedades da porção do epitélio respiratório de interesse. Essas linhagens se dividem em células epiteliais alveolares do tipo I (ATI), também denominadas pavimentosas e células alveolares tipo II (ATII), denominadas células septais, responsáveis pela produção de substâncias tensoativas (Forbes e Ehrhardt, 2005). A linhagem celular do tipo I chamada Calu-3, representativa da porção superior do

pulmão, produz muco, apresenta função barreira e cresce em monocamada de maneira confluyente e íntegra, o que tem justificado o seu uso em estudos com nanopartículas. (Foster *et al.*, 2000; Florea *et al.*, 2003). As células Calu-3 podem ser cultivadas tanto na condição submersa (ambos os lados do poço contendo meio de cultura) quanto ar-interface (quando há a remoção do meio de cultura na parte apical do poço). Porém, a condição escolhida para o cultivo determina a diferenciação dessa célula epitelial: na condição submersa, as estruturas celulares são mais curtas e finas ao passo que na condição ar-interface, tais células apresentam-se ciliadas e com expressão de mucina (responsável pela produção de muco) (Florea *et al.*, 2003; Grenha *et al.*, 2007; Taetz *et al.*, 2009). A capacidade que essas células têm de gerar uma resistência elétrica transepitelial (TER) é outra característica não menos importante. A TER é medida com o auxílio do equipamento Evom<sup>®</sup> que traduz esse sinal em ohms ( $\Omega/\text{cm}^2$ ), cujo valor é utilizado como controle de integridade das junções intercelulares. Assim, o valor de TER é indicativo quando há algum dano no epitélio celular, o que pode comprometer o metabolismo celular (Forbes e Ehrhardt, 2005). A linhagem A549 (AII), oriundas dos alvéolos, também é utilizada para esses fins (Nafee *et al.*, 2012; Grabowski *et al.*, 2013); no entanto, não são capazes de formar TER. Outra possibilidade de estudo ao se utilizar ambas A549 e Calu-3 é a capacidade dessas células em produzirem sinalizadores da resposta inflamatória como, por exemplo, as interleucinas 1, 6 e 8, a partir do estímulo de um lipopolissacarídeo (LPS). Cabe ressaltar que o LPS é um componente da membrana externa de bactérias gram-negativas capaz de induzir a produção de interleucinas, mediada pela ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (Alfaro-Moreno *et al.*, 2009; Abate *et al.*, 2010; Grabowski *et al.*, 2013).

Com base no exposto, o segundo capítulo deste trabalho dedica-se ao estudo *in vitro* da avaliação da citotoxicidade de nanocápsulas poliméricas em células pulmonares. Para tanto, o número de nanocápsulas em suspensão foi estimado e utilizado como parâmetro de dose durante os estudos de citotoxicidade em células representante das partes alveolar (A549) e bronquial (Calu-3) do pulmão. Além disso, esse capítulo demonstra a influência do efeito da nanoencapsulação do deflazacorte sobre a barreira epitelial bem como na secreção de interleucina-8 em

células Calu-3. A ausência de estudos na literatura sobre o uso desse fármaco para esse propósito justifica o ineditismo do trabalho.

O manuscrito a seguir é fruto de um projeto de colaboração entre Brasil-Alemanha, cujos experimentos realizados no exterior contaram com a co-orientação do Professor Dr. Claus Michael-Lehr, na *Universität des Saarlandes*, durante a realização do doutorado-sanduíche no período de dezembro de 2012 até março de 2014, com bolsa de estudo concedida pelas agências de fomento CAPES/DAAD/CNPq.



**Nanoencapsulation of glucocorticoid increases its effect on the epithelial barrier and decreases IL-8 secretion *in vitro* in Calu-3 cell lines.**

Manuscrito a ser submetido para publicação em periódico científico

---



O conteúdo presente nesta publicação desta tese de doutorado refere-se a resultados ainda não publicados, motivo pelo qual foi excluído da versão digital disponibilizada para a Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da UFRGS































































**CAPÍTULO 4:** Desenvolvimento de produtos secos por aspersão a partir de uma suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo um glicocorticoide para uso pulmonar

---



## Revisão do tema

As suspensões de nanopartículas poliméricas são sistemas dispersos complexos devido ao seu tamanho de partícula extremamente pequeno, sendo, em geral, sensíveis aos fenômenos de instabilidade em função do tempo de armazenamento. Assim, a determinação das características físico-químicas dessas suspensões coloidais é de fundamental importância durante os estudos de estabilidade. A partir da determinação dos principais parâmetros físico-químicos de formulações nanoestruturadas, tais como análise morfológica, perfil da distribuição do tamanho de partícula, potencial zeta, índice de polidispersão e pH, em função do tempo, permitem a compreensão de fenômenos físicos de instabilidade durante o armazenamento. A contaminação microbiológica é outro fator que pode vir a desestabilizar esses sistemas, uma vez que tais suspensões muitas vezes utilizam água como meio dispersante (Schaffazick *et al.*, 2003; Tewa-Tagne *et al.*, 2007).

Nesse contexto, observa-se que a aplicabilidade dessas formulações na forma de suspensão pode ser limitada, se considerados períodos prolongados de armazenamento. Tendo em vista os problemas de instabilidade que podem acometer tais sistemas, as técnicas de secagem foram desenvolvidas como alternativas para ampliar as perspectivas de uso comercial desses sistemas. A secagem por aspersão (*spray-drying*), amplamente utilizada na indústria farmacêutica, consiste basicamente de duas etapas. Primeiramente o conteúdo aquoso (suspensão, emulsão ou solução) é aspergido sob a forma de gotículas, resultando num grande aumento de área superficial dentro da torre de secagem. Na segunda etapa ocorre o contato dessas gotículas com uma corrente de ar aquecido, onde ocorre uma transferência de calor e a formação de partículas sólidas em função da rápida evaporação do solvente (água ou solvente orgânico). Como o processo de evaporação é bastante rápido, as gotículas não atingem altas temperaturas, o que torna possível o uso de fármacos e substâncias termossensíveis. É importante destacar que o sucesso de um processo de secagem dessa natureza depende de alguns fatores que devem ser precisamente observados, tais como adjuvantes de secagem, temperatura de secagem e o fluxo de alimentação. Esses fatores devem ser controlados visando a um alto rendimento,

teor de umidade adequado, estabilidade química dos componentes da formulação e a reduzida aderência das partículas no interior da câmara de secagem (*sticking*) (Esposito *et al.*, 2002).

Alguns estudos na literatura apontam que a produção de pós secos por aspersão a partir de suspensões de nanopartículas poliméricas é bastante promissora, uma vez que esse tipo de secagem agrega vantagens tecnológicas para essas formulações. Müller e colaboradores publicaram em 2001 o primeiro trabalho sobre a secagem de uma suspensão de nanocápsulas de poli( $\epsilon$ -caprolactona), utilizando a técnica de secagem por aspersão, tendo o dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem. Nesse trabalho pioneiro, foi demonstrado, através de análises de microscopia eletrônica que as nanocápsulas mantinham suas propriedades nanotecnológicas após o processo de secagem, além do aumento da estabilidade dessas formulações. Além disso, os autores sugerem que a secagem viabiliza a obtenção de produtos intermediários para produção de formas farmacêuticas sólidas, como por exemplo, granulados e comprimidos, que são de grande interesse para a indústria farmacêutica (Muller *et al.*, 2001). A partir de então, uma série trabalhos foram publicados, confirmando as vantagens desse avanço tecnológico. Pohlmann e colaboradores (2002) submeteram ao processo de secagem por aspersão suspensões de nanocápsulas e nanoesferas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) contendo indometacina, utilizando dióxido de silício como adjuvante de secagem. Os pós obtidos mantiveram teor de fármaco em torno de 100% e as características morfológicas durante 5 meses de armazenamento (Raffin Pohlmann *et al.*, 2002). Mais tarde, Raffin e colaboradores (2002) utilizaram essas nanocápsulas secas por aspersão e constataram que essas foram eficientes na proteção da mucosa intestinal (Raffin Pohlmann *et al.*, 2002). Kho e colaboradores (2010) desenvolveram pós secos por meio dessa mesma técnica de secagem a partir de nanopartículas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) de levofloxacino e avaliaram a influência diferentes adjuvantes sobre as características desses pós (Kho *et al.*, 2010).

A via pulmonar pode ser considerada uma rota alternativa de administração de fármacos em comparação com outros métodos clássicos de administração (oral e

intravenosa), por apresentar algumas vantagens como grande área de superfície de absorção (80 - 100 m<sup>2</sup>/ adulto), alta vascularidade tecidual (5 l/ min) e a possibilidade de aplicação de fármacos tanto para efeito local quanto sistêmico. O fato de se evitar o metabolismo hepático de primeira passagem por essa via também é outra vantagem, embora o pulmão apresente alguma atividade metabólica que não pode ser desconsiderada. Por outro lado, a via pulmonar possui algumas desvantagens como a rápida depuração mucociliar e a necessidade de aplicação de 3 ou 4 doses diárias de fármaco (Frijlink e De Boer, 2004).

Em linhas gerais, as plataformas de administração de fármacos pela via pulmonar dividem-se em três categorias: nebulizadores, inaladores com dispositivo dosador (MDI, do inglês *metered dose inhaler*) e sistemas inaladores de pós secos (DPI, do inglês *dry powder inhaler*). Todos os três sistemas dispõem de diferentes mecanismos de liberação e, portanto, requerem tipos de formulações específicas. Os nebulizadores foram os primeiros dispositivos a entrarem no mercado delineados para o *delivery* pulmonar. Esses dispositivos geram gotículas através da atomização de um líquido (solução ou suspensão) por meio de mecanismos ultrassônicos ou jatos de ar. Essas gotículas, no entanto, apresentam volumes inferiores a 50 µm, com alto índice de polidispersão, baixa eficiência e alta variabilidade de dose. Além disso, o tempo elevado para a obtenção do efeito (cerca de 30 min), as dificuldades quanto à portabilidade e limpeza do dispositivo são desvantagens inerentes dos nebulizadores (Frijlink e De Boer, 2004).

Os dispositivos MDI, introduzidos no mercado na década de 50, são atualmente os mais utilizados. Nesse tipo de dispositivo o fármaco encontra-se dissolvido ou suspenso em um líquido propelente que, quando acionado, libera uma dose predeterminada de fármaco. Um mecanismo faz que a formulação sofra, antes de ser descarregada pelo orifício, uma expansão de volume gerado pela mistura gás-líquido, aspergindo-o em gotículas pequenas. Esse tipo de dispositivo apresenta algumas dificuldades no momento do uso, pois requer atitudes por parte do paciente como coordenação entre ativação-inalação e agitação adequada do recipiente. (Frijlink e De Boer, 2004; Bailey e Berkland, 2009).

Em razão das dificuldades comentadas no parágrafo anterior, os dispositivos DPI's foram desenvolvidos como um sistema inalatório mais simples, sem uso de propelentes. Nesse caso o dispositivo está pré-carregado com o fármaco na forma de pó contido em cápsulas duras de gelatina ou em blisteres discoidais, os quais são carregados antes do uso. Os DPI's subdividem-se em dispositivos de dose unitária, multidose com fármacos em blister e multidose com fármacos pré-carregados, sendo acionados pela respiração, evitando o problema da necessidade de coordenar a respiração com o acionamento. No entanto, os DPI's também apresentam algumas desvantagens como a necessidade de desagregação das partículas de fármaco no momento do uso e a execução correta do procedimento de inalação, de forma que proporcione uma adequada deposição das partículas nos pulmões (Daniher e Zhu, 2008).

Com relação à deposição das partículas a partir de pós secos nos pulmões, esse processo pode ocorrer por impactação (ou colisão inercial), sedimentação ou difusão. Devido à capacidade seletiva natural do trato respiratório, as partículas que apresentarem diâmetro aerodinâmico maior que 10  $\mu\text{m}$  irão se depositar por impactação na região orofaríngea ou na região superior bronquial. Por outro lado, as partículas de diâmetro aerodinâmico inferior a 1  $\mu\text{m}$  estão mais sujeitas a alcançar a região alveolar; porém, estas não se depositam facilmente, uma vez que o movimento Browniano exerce influência sobre as mesmas, o que favorece que sejam logo exaladas (expulsão). Assim, as partículas que apresentam diâmetro aerodinâmico entre 0.5–5  $\mu\text{m}$  são consideradas ideais para a condução de fármacos ao pulmão, pois devem apresentar boa distribuição ao longo do trato pulmonar (Bailey e Berkland, 2009).

Nesse sentido, considerando as vantagens tecnológicas das suspensões de nanocápsulas poliméricas e a técnica de secagem por aspersão, o desenvolvimento de formas farmacêuticas pulverulentas contendo essas partículas pode contribuir para a terapia pulmonar, através da possibilidade de controlar a liberação de fármacos, o que reduz a frequência de doses e, ao mesmo tempo, aumenta a adesão do paciente ao tratamento (Sung *et al.*, 2007).

Conforme mencionado anteriormente, as formas farmacêuticas pulverulentas destinadas à administração pulmonar devem obedecer algumas características físico-químicas específicas, especialmente com relação ao diâmetro aerodinâmico. A determinação dessa característica é muito importante durante o processo de pré-formulação, pois é do diâmetro aerodinâmico que dependerá o local de deposição das partículas ao longo do trato pulmonar (Frijlink e De Boer, 2004). O diâmetro aerodinâmico médio é dependente de outras características a serem determinadas, como a densidade e o diâmetro geométrico das partículas. O fluxo do pó é outra característica importante a ser determinada em um pó para inalação. O uso de adjuvantes de secagem pode melhorar essas características a partir da formação de aglomerados (ou micro-agregados) e, ao mesmo tempo, proporcionar a desagregação dos micro-agregados ao serem atingidos por um fluxo de ar turbulento (Pilcer e Amighi, 2010). A adequada desagregação dos micro-agregados favorece a liberação do fármaco que os compõem, além de facilitar a uniformidade de dose durante o enchimento da plataforma que o veiculará (cápsula, dispositivos inaladores de dose unitária ou multi-dose) (Chow *et al.*, 2007; Tewa-Tagne *et al.*, 2007; Kho *et al.*, 2010; Demoly *et al.*, 2014).

A lactose é um dos adjuvantes de secagem descritos para a obtenção de micro-agregados a partir de suspensões de nanopartículas para uso pulmonar. Sham e colaboradores (2004) desenvolveram pós secos por aspersão para administração pulmonar a partir de uma suspensão de nanopartículas de poli (n-butil cianocrilato), utilizando lactose na concentração de 5%. Após o processo de secagem, as partículas apresentaram formato esférico, tamanho médio de 3,0  $\mu\text{m}$  e fração respirável em torno de 40%. Os autores destacam ainda que esse adjuvante destaca-se por apresentar algumas vantagens tecnológicas como solubilidade em meio aquoso, preservar as características morfológicas das partículas após a secagem além de ser um produto aprovado pela agência regulatória americana *Food and Drug Administration*. (Sham *et al.*, 2004). Kho e colaboradores (2010) desenvolveram uma plataforma de DPI a partir da secagem por aspersão de nanopartículas de poli( $\epsilon$ -caprolactona) utilizando levofloxacino como fármaco modelo. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos de diferentes adjuvantes de secagem (manitol e lactose) e suas combinações com leucina sobre as

características físico-químicas do pó. Através de análises morfológicas os autores mostraram a capacidade que esses adjuvantes combinados ou não com leucina têm de manter a estrutura das nanopartículas. Além disso, foi demonstrado que a associação da leucina com esses adjuvantes melhora as características de fluxo dos micro-agregados. Por outro lado, os micro-agregados obtidos com o uso da leucina apresentam menor rendimento do que aqueles obtidos somente com o uso dos carboidratos como adjuvantes de secagem (Kho *et al.*, 2010).

A leucina é um aminoácido que vem sendo cada vez mais utilizada como adjuvante de secagem no desenvolvimento de formulações pulverulentas para administração pulmonar. Diversos estudos na literatura têm demonstrado vantagens quanto ao uso desse excipiente na secagem de formulações para uso pulmonar, especialmente com relação ao melhoramento das características de fluxo dos pós. Seville e colaboradores (2007) avaliaram a influência de diferentes aminoácidos, incluindo a leucina, a fim de estudar a influência desses aminoácidos sobre as características de fluxo de pós secos por aspersão a partir de uma solução aquosa de salbutamol, utilizando lactose como material de constituição de partícula. As partículas apresentaram diâmetros similares (em torno de 5  $\mu\text{m}$ ) independente do tipo de aminoácido empregado, sendo o pós secos com leucina os que apresentaram melhor aerossolização em todas as concentrações testadas (5-10%) em comparação com os outros aminoácidos (arginina, ácido aspártico, fenilalanina e treonina) (Seville *et al.*, 2007). Em razão da característica hidrofóbica da leucina, Aquino e colaboradores (2012) escolheram esse aminoácido objetivando reduzir a higroscopicidade do antibiótico gentamicina para produção de micropartículas a partir de uma solução contendo o fármaco, água e etanol. As partículas apresentaram diâmetro aerodinâmico dentro da faixa preconizada, com valores de FPF variando de 20-40% dependendo da concentração de leucina. Análises morfológicas das partículas demonstraram uma superfície rugosa independente da concentração da leucina, cuja característica atribuiu-se a boa capacidade de dispersão desses pós. Além disso, tais partículas não apresentaram efeitos citotóxicos ou citostáticos em modelos de células epiteliais dos brônquios (Aquino *et al.*, 2012).

Após a caracterização físico-química de um pó, torna-se difícil estimar se uma partícula com velocidade, diâmetro e massa conhecida irá realmente se distribuir de forma adequada nos pulmões, tendo em vista a dificuldade em mensurar adequadamente o fluxo de ar no interior dos pulmões e a deposição aleatória das partículas em diferentes posições no trato pulmonar (Rabbani e Seville, 2005; Daniher e Zhu, 2008). Além disso, devem-se levar em consideração as diferenças entre os dispositivos de administração, a natureza da patologia que acomete o trato pulmonar bem como fatores inerentes de cada indivíduo (Frijlink e De Boer, 2004; Daniher e Zhu, 2008). Os impactadores em cascata são equipamentos que simulam a deposição *in vitro* dessas partículas, cujo resultado é bastante útil durante o desenvolvimento de pós para inalação. Esses equipamentos, como o impactador do tipo Andersen, por exemplo, classificam as partículas pelo diâmetro aerodinâmico predominante no pó com o uso de um jogo de oito discos de metal (estágios de separação). Cada disco possui, individualmente, uma abertura de poro específica, que simula àqueles existentes ao longo do trato pulmonar, imitando a propriedade seletora dos pulmões. Para tanto, as partículas são forçadas a perpassar os discos via fluxo de ar, onde o tamanho da malha diminui, favorecendo o fracionamento do pó de acordo com o tamanho. As partículas maiores e mais densas tendem a se depositar nas regiões superiores do impactador, ao passo que as menores acompanharão o fluxo do ar e se depositarão na parte inferior do jogo de discos. Então o pó é coletado em cada estágio e a quantidade de fármaco é indicativa da quantidade de pó depositada em cada estágio. A partir disso é possível demonstrar em forma gráfica o desempenho do pó bem com o cálculo da sua fração respirável do pó (FPF, do inglês *Fine Particle Fraction*), cuja porção reflete a totalidade das partículas capazes de alcançar as regiões mais profundas do pulmão (Frijlink e De Boer, 2004; Rabbani e Seville, 2005).

As doenças do trato respiratório ocupam o terceiro lugar de causa de morte mundial (4,2 milhões), sendo precedida por doenças cardiovasculares (17 milhões) e câncer (7,6 milhões). Asma, broncopatias e processos inflamatórios são as condições patológicas que mais acometem o pulmão, sendo os países em desenvolvimento responsáveis pela maioria do número de mortes ocasionadas por doenças respiratórias (Sevenoaks e Stockley, 2006). O tratamento com

glicocorticoides em processos inflamatórios é indispensável nessas condições (Newton *et al.*, 2010). O deflazacorte é um fármaco pertencente a essa classe terapêutica e que possui potente efeito anti-inflamatório. Atualmente o deflazacorte é comercializado na forma de comprimidos e suspensão oral, sendo indicado para o tratamento de doenças do trato respiratório como sarcoidose, síndrome de Loeffler, fibrose pulmonar idiopática e pneumonia alérgica (Rizzato *et al.*, 1997). Até o momento não há relatos na literatura sobre obtenção de uma forma farmacêutica pulverulenta a partir de uma suspensão de nanocápsulas contendo deflazacorte visando à sua administração pulmonar.

A partir do exposto, o terceiro e último capítulo aborda de forma inédita o desenvolvimento de uma plataforma DPI por meio da técnica de secagem por aspersão de uma suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo deflazacorte visando à administração pulmonar. Para tanto foi realizado um estudo sobre a influência de dois adjuvantes de secagem, lactose e leucina, em diferentes concentrações (5 e 10%) sobre as características aerodinâmicas dos pós, considerando as propriedades adequadas que essa forma farmacêutica requer para administração pulmonar.

**Dry powders inhalers containing deflazacort loaded-polymeric nanocapsules  
for pulmonary therapy: *in vitro* aerodynamic properties**

Manuscrito a ser submetido para publicação em periódico científico

---



O conteúdo presente nesta publicação desta tese de doutorado refere-se a resultados ainda não publicados, motivo pelo qual foi excluído da versão digital disponibilizada para a Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da UFRGS.















































A nanotecnologia é uma área de grande interesse do setor farmacêutico, pois possibilita a aplicação de fármacos e outras substâncias ativas através de sistemas coloidais os quais podem proporcionar maior eficácia terapêutica e diminuição dos efeitos colaterais. O avanço das pesquisas nos centros acadêmicos nessa área do conhecimento tem despertado o interesse da indústria farmacêutica, que tem priorizado de forma crescente a aplicação de recursos em diversas linhas de pesquisa. Entre os diferentes tipos de sistemas nanoestruturados, as nanopartículas poliméricas destacam-se pela grande capacidade de carrear uma diversidade de fármacos, sendo planejadas especialmente para administração parenteral, oral e tópica (Marcato e Duran, 2008; Mora-Huertas *et al.*, 2010).

Após o advento das nanopartículas poliméricas na década de oitenta, inúmeras pesquisas revelaram uma miríade de possibilidades de aplicação desses nanossistemas na terapêutica. Ao longo desses anos muito conhecimento sobre as características físico-químicas dessas nanopartículas foi gerado. Em um curto espaço de tempo é possível conhecer, através de um conjunto de informações, o comportamento e a influência de cada componente sobre diferentes características e propriedades da formulação (Mora-Huertas *et al.*, 2011; Mora-Huertas *et al.*, 2012). No entanto, a comercialização desses produtos farmacêuticos está ainda aquém das expectativas, considerando suas potencialidades.

Um conjunto de fatores como a avaliação da toxicidade específica de cada formulação em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*, consenso e regulamentação por parte de órgãos regulatórios da área da saúde e, especialmente, a transposição da escala laboratorial para industrial dificultam a introdução desses produtos no mercado farmacêutico. Durante o desenvolvimento de processo de qualquer produto de cunho farmacêutico, a etapa de escalonamento é imprescindível para que o mesmo alcance o mercado.

A partir do exposto, o primeiro capítulo desta tese abordou o desenvolvimento de um processo de produção de nanocápsulas poliméricas pelo método de emulsificação-difusão utilizando a homogeneização à alta pressão. Através de diferentes técnicas de caracterização físico-química, os resultados mostraram que é possível obter uma suspensão de nanopartículas poliméricas, considerando as

condições propostas. Além disso, o novo processo resulta em uma formulação com distribuição granulométrica mais estreita e homogênea em comparação com nanocápsulas polimérica produzidas via nanoprecipitação. A propriedade de se obter uma suspensão contendo somente nanocápsulas poliméricas foi respeitada, conforme observado através dos estudos de densidade. Os resultados obtidos a partir desse estudo levaram à redação de um relatório de patente, cujo depósito de pedido de patente está protocolado junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

No segundo capítulo foi estudado o potencial de aplicação de uma suspensão de nanocápsulas poliméricas para o uso pulmonar. Para tanto, um estudo *in vitro* de citotoxicidade dessa suspensão em células representativas das porções alveolar (A549) e bronquial (Calu-3) foi realizado através do uso de dois testes que identificam a citotoxicidade (LDH) e a viabilidade (Alamar Blue) dessas células. Porém, utilizou-se a concentração de nanopartículas por unidade de volume como parâmetro de toxicidade. Após a seleção da concentração de partículas que não causou danos significativos a essas células, foi realizado um estudo sobre a influência da nanoencapsulação na função barreira de células Calu-3. Uma suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo o glicocorticoide deflazacorte foi preparada e colocada em contato com esse tipo de célula. Os resultados demonstraram que a nanoencapsulação do fármaco aumentou a integridade da barreira epitelial e também diminuiu a permeação de soluto através de células Calu-3 em comparação com o controle. Além disso, essa formulação de nanocápsulas influenciou na secreção de um mediador pró-inflamatório, diminuindo os níveis de interleucina-8 após 48 horas de exposição. Isso significa que a nanoencapsulação influencia no tempo de ação, mas não no efeito anti-inflamatório característico do fármaco. Esse resultado foi suplantado por um estudo de liberação *in vitro*, onde foi demonstrada a capacidade dessa suspensão em modular a liberação do fármaco em comparação com uma solução contendo o mesmo na forma não encapsulada. A partir desses resultados foi demonstrada a possibilidade de aplicação dessa formulação de nanocápsulas poliméricas como um potencial nanocarreador para a via pulmonar, não somente para fármacos indicados para essa via, mas também para outros ativos de interesse, visto que a concentração de  $9.85E+11$  partículas/ml

apresentou baixa toxicidade em ambos os tipos de células testados. Ainda, essa suspensão também é candidata para aplicação por essa via de administração especialmente para doenças cujo quadro clínico requer a restauração da função barreira bem como a diminuição dos níveis de agentes promotores de recrutamento de células pró-inflamatórias.

As suspensões de nanocápsulas poliméricas são sensíveis aos fenômenos de instabilidade, cujos efeitos limitam o tempo de uso desses produtos, reduzindo a aplicabilidade desses sistemas. A preparação de uma forma pulverulenta a partir de uma solução contendo fármaco e excipientes farmacêuticos como materiais de secagem é um processo farmacêutico bastante consolidado. A secagem de suspensões de nanopartículas poliméricas é um tema bastante promissor no que tange às pesquisas sobre sistemas nanoestruturados (Raffin Pohlmann *et al.*, 2002; Sung *et al.*, 2007; Guterres *et al.*, 2009). Alguns fatores são bastante influentes nas características físico-químicas dos pós, sendo o tipo de adjuvante de secagem um dos principais personagens para o sucesso de obtenção de um pó adequado para inalação (Frijlink e De Boer, 2004; Daniher e Zhu, 2008).

O glicocorticoide deflazacorte, um dos objetos desse estudo, está disponível comercialmente somente para administração pela via oral (comprimidos e suspensão oral). Esse fato, portanto, foi o fator motivador para a proposta de trabalho. Nesse contexto, o terceiro e último capítulo apresentou o desenvolvimento de uma suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo o fármaco deflazacorte bem como a subsequente produção de uma forma farmacêutica pulverulenta a partir dessa suspensão, visando à administração pela via pulmonar. Para tanto, a influência dos adjuvantes de secagem leucina e lactose em diferentes concentrações (5 e 10 %) sobre as características aerodinâmicas dos pós foi avaliada. Após a preparação e caracterização da suspensão de nanocápsulas contendo o fármaco, procedeu-se a secagem por aspensão dessa formulação. Embora o rendimento da formulação preparada com leucina a 5% tenha sido menor em comparação à formulação obtida a partir da lactose a 10%, esse pó apresentou maior teor de fármaco. Já as formulações preparadas com leucina 10% e lactose a 5% foram descartadas, devido ao baixo rendimento obtido no processo de secagem.

Os pós secos por aspersão com lactose e leucina nas concentrações de 10 e 5% respectivamente apresentaram valores de diâmetro aerodinâmico de  $5,13 \pm 0,18 \mu\text{m}$  e  $7,52 \pm 0,22 \mu\text{m}$ , respectivamente. Adicionalmente, o pó seco a partir do uso do aminoácido como adjuvante de secagem apresentou maior capacidade de aerossolização das partículas, considerando a comparação dos resultados entre os dois pós através do experimento que simula *in vitro* a deposição das partículas no trato respiratório. Com base nesses resultados, o pó seco com leucina na concentração de 5% a partir de nanocápsulas poliméricas contendo deflazacorte pode ser sugerido como uma forma farmacêutica pulverulenta para administração desse glicocorticoide através da inalação para o tratamento de doenças inflamatórias da via pulmonar.

**CONCLUSÕES**

---



- A homogeneização à alta pressão foi proposta, de forma inédita, como um novo processo para a produção de suspensão de nanocápsulas poliméricas empregando o método de emulsificação-difusão;
- As nanocápsulas poliméricas obtidas a partir do novo processo apresentam características nanométricas adequadas, com estreita distribuição de diâmetro de partícula e baixa polidispersão, e não coexistência de outras estruturas supramoleculares na suspensão;
- O uso da concentração de nanocápsulas poliméricas como parâmetro de dose foi fundamental nos estudos *in vitro* de citotoxicidade em células pulmonares;
- O efeito da nanoencapsulação do glicocorticoide deflazacorte apresentou influencia na função barreira de células bronquiais Calu-3;
- A suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo esse fármaco demonstrou efeito anti-inflamatório *in vitro* após 48 horas;
- A secagem por aspersão de uma suspensão de nanocápsulas poliméricas contendo deflazacorte visando à administração pulmonar foi proposto de maneira inédita para este fármaco;
- O uso da leucina como adjuvante de secagem na concentração de 5% foi essencial para a obtenção de uma forma farmacêutica pulverulenta com características adequadas para o uso pulmonar.



## REFERÊNCIAS

---



ABATE, W. et al. Surfactant lipids regulate LPS-induced interleukin-8 production in A549 lung epithelial cells by inhibiting translocation of TLR4 into lipid raft domains. **J Lipid Res**, v. 51, p. 334-44, 2010.

ALBANESE, A.; TANG, P. S.; CHAN, W. C. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 14, p. 1-16, 2012.

ALFARO-MORENO, E. et al. Induction of IL-6 and inhibition of IL-8 secretion in the human airway cell line Calu-3 by urban particulate matter collected with a modified method of PM sampling. **Environmental Research**, v. 109, p. 528-535, 2009.

ALMEIDA, J. S. et al. Nanostructured Systems Containing Rutin: In Vitro Antioxidant Activity and Photostability Studies. **Nanoscale Res Lett**, v. 5, p. 1603-1610, 2010.

AQUINO, R. P. et al. Dry powder inhalers of gentamicin and leucine: formulation parameters, aerosol performance and in vitro toxicity on CuFi1 cells. **Int J Pharm**, v. 426, p. 100-7, 2012.

ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 258, p. 151-165, 2012.

AZARMI, S.; ROA, W. H.; LÖBENBERG, R. Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 863-875, 2008.

BAILEY, M. M.; BERKLAND, C. J. Nanoparticle formulations in pulmonary drug delivery. **Med Res Rev**, v. 29, p. 196-212, 2009.

BARRENA, R. et al. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. **Chemosphere**, v. 75, p. 850-7, 2009.

BECK, R. C. et al. Dexamethasone-loaded nanoparticle-coated microparticles: correlation between in vitro drug release and drug transport across Caco-2 cell monolayers. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 67, p. 18-30, 2007.

- BENVEGNO, D. M. et al. Haloperidol-loaded polysorbate-coated polymeric nanocapsules increase its efficacy in the antipsychotic treatment in rats. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 77, p. 332-6, 2011.
- BERNARDI, A. et al. Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats. **Br J Pharmacol**, v. 158, p. 1104-11, 2009.
- BOARDMAN, C. et al. Mechanisms of glucocorticoid action and insensitivity in airways disease. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 29, p. 129-143, 2014.
- CARTIERA, M. S. et al. Partial Correction of Cystic Fibrosis Defects with PLGA Nanoparticles Encapsulating Curcumin. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, p. 86-93, 2009.
- CHOW, A. H. et al. Particle engineering for pulmonary drug delivery. **Pharm Res**, v. 24, p. 411-37, 2007.
- DANIHER, D. I.; ZHU, J. Dry powder platform for pulmonary drug delivery. **Particuology**, v. 6, p. 225-238, 2008.
- DEMOLY, P. et al. The clinical relevance of dry powder inhaler performance for drug delivery. **Respiratory Medicine**, v. 108, p. 1195-1203, 2014.
- DIMER, F. A. et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, p. 1520-1526, 2013.
- DONALDSON, K. et al. Nanotoxicology. **Occupational and Environmental Medicine**, v. 61, p. 727-728, 2004.
- DONG, Y.; FENG, S. S. Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles prepared by high pressure homogenization for paclitaxel chemotherapy. **Int J Pharm**, v. 342, p. 208-14, 2007.
- ELSAESSER, A.; HOWARD, C. V. Toxicology of nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 129-137, 2012.
- ESPOSITO, E. et al. Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. **Int J Pharm**, v. 242, p. 329-34, 2002.

FERRARIS, J. R. et al. Effects of deflazacort vs. methylprednisone: a randomized study in kidney transplant patients. **Pediatr Nephrol**, v. 22, p. 734-41, 2007.

FERREIRA, A. J.; CEMLYN-JONES, J.; ROBALO CORDEIRO, C. Nanoparticles, nanotechnology and pulmonary nanotoxicology. **Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)**, v. 19, p. 28-37, 2013.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P. Procédé de préparation dês systèmes coloïdaux d'une substance sous forme de nanocapsules. **European Patent, 0274961 A1.**, 1988.

FLOREA, B. I. et al. Drug transport and metabolism characteristics of the human airway epithelial cell line Calu-3. **J Control Release**, v. 87, p. 131-8, 2003.

FONTANA, M. C. et al. Nanoencapsulation as a way to control the release and to increase the photostability of clobetasol propionate: influence of the nanostructured system. **J Biomed Nanotechnol**, v. 5, p. 254-63, 2009.

FONTANA, M. C. et al. Nanocapsules prepared from amorphous polyesters: effect on the physicochemical characteristics, drug release, and photostability. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 10, p. 3091-9, 2010.

FORBES, B.; EHRHARDT, C. Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, p. 193-205, 2005.

FOSTER, K. A. et al. Characterization of the Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery. **Int J Pharm**, v. 208, p. 1-11, 2000.

FRESHNEY, R. I. Basic Principles of Cell Culture. In: (Ed.). **Culture of Cells for Tissue Engineering**: John Wiley & Sons, Inc., 2006. p.1-22. ISBN 9780471741817.

FRIEDRICH, R. B. et al. Development and physicochemical characterization of dexamethasone-loaded polymeric nanocapsule suspensions. **Química Nova**, v. 31, p. 1131-1136, 2008.

FRIJLINK, H. W.; DE BOER, A. H. Dry powder inhalers for pulmonary drug delivery. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 1, p. 67-86, 2004.

- GALINDO-RODRÍGUEZ, S. A. et al. Comparative scale-up of three methods for producing ibuprofen-loaded nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, p. 357-367, 2005.
- GRABOWSKI, N. et al. Toxicity of surface-modified PLGA nanoparticles toward lung alveolar epithelial cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 454, p. 686-694, 2013.
- GRAINGER, C. I. et al. Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier. **Pharm Res**, v. 23, p. 1482-90, 2006.
- GRAY, R. E. S. et al. A double-blind study of deflazacort and prednisone in patients with chronic inflammatory disorders. **Arthritis & Rheumatism**, v. 34, p. 287-295, 1991.
- GRENHA, A. et al. Chitosan nanoparticles are compatible with respiratory epithelial cells in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 31, p. 73-84, 2007.
- GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Spray-drying technique to prepare innovative nanoparticulated formulations for drug administration: a brief overview. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, p. 205-209, 2009.
- HAFNER, A. et al. Nanotherapeutics in the EU: an overview on current state and future directions. **Int J Nanomedicine**, v. 9, p. 1005-23, 2014.
- HARTUNG, T.; DASTON, G. Are in vitro tests suitable for regulatory use? **Toxicol Sci**, v. 111, p. 233-7, 2009.
- JAISWAL, J.; GUPTA, S. K.; KREUTER, J. Preparation of biodegradable cyclosporine nanoparticles by high-pressure emulsification-solvent evaporation process. **J Control Release**, v. 96, p. 169-78, 2004.
- JULIANO, C. et al. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. **Int J Pharm**, v. 299, p. 146-54, 2005.
- KHO, K. et al. Aqueous re-dispersibility of spray-dried antibiotic-loaded polycaprolactone nanoparticle aggregates for inhaled anti-biofilm therapy. **Powder Technology**, v. 203, p. 432-439, 2010.

KUMARI, A.; YADAV, S. K.; YADAV, S. C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, p. 1-18, 2010.

LINKOV, I.; SATTERSTROM, F. K.; COREY, L. M. Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 4, p. 167-171, 2008.

MARCATO, P. D.; DURAN, N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. **J Nanosci Nanotechnol**, v. 8, p. 2216-29, 2008.

MATSUO, Y. et al. Effect of betamethasone phosphate loaded polymeric nanoparticles on a murine asthma model. **Cellular Immunology**, v. 260, p. 33-38, 2009.

MOINARD-CHÉCOT, D. et al. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion–diffusion process. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 317, p. 458-468, 2008.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods critical comparison. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v. 163, p. 90-122, 2011.

MORA-HUERTAS, C. E. et al. Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification-diffusion methods: comparative study. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 80, p. 235-9, 2012.

MULLER, C. R. et al. Spray-dried diclofenac-loaded poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules and nanospheres. Preparation and physicochemical characterization. **Pharmazie**, v. 56, p. 864-7, 2001.

NAFEE, N. et al. Treatment of lung cancer via telomerase inhibition: Self-assembled nanoplexes versus polymeric nanoparticles as vectors for 2'-O-Methyl-RNA. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, p. 478-489, 2012.

NEWTON, R.; LEIGH, R.; GIEMBYCZ, M. A. Pharmacological strategies for improving the efficacy and therapeutic ratio of glucocorticoids in inflammatory lung diseases. **Pharmacol Ther**, v. 125, p. 286-327, 2010.

NOWACK, B.; BUCHELI, T. D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environmental Pollution**, v. 150, p. 5-22, 2007.

OBERDORSTER, G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. **J Intern Med**, v. 267, p. 89-105, 2010.

OBERDORSTER, G.; OBERDORSTER, E.; OBERDORSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environ Health Perspect**, v. 113, p. 823-39, 2005.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, v. 33, p. 421-430, 2010.

PILCER, G.; AMIGHI, K. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. **Int J Pharm**, v. 392, p. 1-19, 2010.

QUINTANAR-GUERRERO, D. et al. Preparation and Characterization of Nanocapsules from Preformed Polymers by a New Process Based on Emulsification-Diffusion Technique. **Pharmaceutical Research**, v. 15, p. 1056-1062, 1998.

RABBANI, N. R.; SEVILLE, P. C. The influence of formulation components on the aerosolisation properties of spray-dried powders. **J Control Release**, v. 110, p. 130-40, 2005.

RAFFIN POHLMANN, A. et al. Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 305-312, 2002.

RIGO, L. A. et al. Nanoencapsulation of rice bran oil increases its protective effects against UVB radiation-induced skin injury in mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, p. 11-17, 2015.

RIGO, L. A. et al. Influence of the type of vegetable oil on the drug release profile from lipid-core nanocapsules and in vivo genotoxicity study. **Pharm Dev Technol**, v. 19, p. 789-98, 2014.

RIGO, L. A.; RASCOVETSKY, R. H.; BECK, R. C. Sunscreen Formulations Containing Rice Bran or Soybean Oil: Rheological Properties, Spreadability and In Vitro Sun Protection Factor. **Lat Am J Pharm**, v. 30, p. 246-52, 2010.

RIZZATO, G. et al. The long-term efficacy and safety of two different corticosteroids in chronic sarcoidosis. **Respir Med**, v. 91, p. 449-60, 1997.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SCHIFFELERS, M.-J. W. A. et al. Regulatory acceptance and use of 3R models for pharmaceuticals and chemicals: Expert opinions on the state of affairs and the way forward. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, p. 41-48, 2014.

SCREMIN, A. et al. Spectrophotometric and HPLC determination of deflazacort in pharmaceutical dosage forms. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 281-287, 2010.

SEKIYAMA, A. et al. Glucocorticoids enhance airway epithelial barrier integrity. **Int Immunopharmacol**, v. 12, p. 350-7, 2012.

SEVENOAKS, M.; STOCKLEY, R. Chronic Obstructive Pulmonary Disease, inflammation and co-morbidity - a common inflammatory phenotype? **Respiratory Research**, v. 7, p. 70, 2006.

SEVILLE, P. C. et al. Amino acid-modified spray-dried powders with enhanced aerosolisation properties for pulmonary drug delivery. **Powder Technology**, v. 178, p. 40-50, 2007.

SHAM, J. O. H. et al. Formulation and characterization of spray-dried powders containing nanoparticles for aerosol delivery to the lung. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, p. 457-467, 2004.

SOPPIMATH, K. S. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

SUNG, J. C.; PULLIAM, B. L.; EDWARDS, D. A. Nanoparticles for drug delivery to the lungs. **Trends Biotechnol**, v. 25, p. 563-70, 2007.

SURI S, S.; FENNIRI, H.; SINHG, B. Nanotechnology-based drug delivery systems. **JOM-J OCCUP MED**, v. 2, p. 16 - 21, 2007.

TAETZ, S. et al. The influence of chitosan content in cationic chitosan/PLGA nanoparticles on the delivery efficiency of antisense 2'-O-methyl-RNA directed against telomerase in lung cancer cells. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, p. 358-369, 2009.

TERRY, C. et al. Innovations in toxicity testing—An integrated approach based on the “3R” principles of animal welfare and sound science. **Toxicology Letters**, v. 205, Supplement, p. S244, 2011.

TEWA-TAGNE, P.; BRIANÇON, S.; FESSI, H. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: Development and characterisation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, p. 124-135, 2007.

THORLEY, A. J.; TETLEY, T. D. New perspectives in nanomedicine. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 140, p. 176-185, 2013.

VAUTHIER, C.; BOUCHEMAL, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, p. 1025-1058, 2009.

VENTURINI, C. G. et al. Formulation of lipid core nanocapsules. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 375, p. 200-208, 2011.

VERMA, A.; STELLACCI, F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. **Small**, v. 6, p. 12-21, 2010.

WITTMACK, K. In search of the most relevant parameter for quantifying lung inflammatory response to nanoparticle exposure: particle number, surface area, or what? **Environ Health Perspect**, v. 115, p. 187-94, 2007.

ZHANG, Y. et al. Preparation, characterization and biocompatibility of poly(ethylene glycol)-poly(n-butyl cyanoacrylate) nanocapsules with oil core via miniemulsion polymerization. **European Polymer Journal**, v. 44, p. 1654-1661, 2008.





**ANEXO 1: Validação de método analítico para doseamento de deflazacorte em suspensão de nanocápsulas poliméricas e produtos secos por aspersão.**

O método analítico para doseamento do fármaco deflazacorte tanto na suspensão de nanocápsulas quanto nos produtos secos por aspersão, obtidos a partir do uso de leucina e lactose como adjuvante de secagem, foi realizado empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As condições cromatográficas utilizadas na validação basearam-se em um método previamente descrito na literatura por Scremin e colaboradores (Tabela 1)(Scremin *et al.*, 2010)

Tabela 1. Parâmetros cromatográficos utilizados na metodologia analítica para doseamento do deflazacorte a partir das formulações.

Parâmetros	Condições
Detecção	UV ( $\lambda = 244$ nm)
Fluxo	1,0 mL/min
Coluna	C18 250 x 4,6 mm 5 $\mu$ m
Fase móvel	Acetonitrila:água (80:20 v/v)
Volume de injeção	20 $\mu$ L

Uma varredura realizada em espectrofotômetro UV/Visível na faixa de 200-400 nm confirmou que o comprimento de onda que o fármaco apresenta maior absorção é realmente 244 nm. A partir disso, os parâmetros especificidade, linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e limites de quantificação e detecção.

## 1. Especificidade

Para a avaliação da especificidade, uma suspensão de nanocápsulas poliméricas foi preparada da mesma forma que a suspensão de nanocápsulas contendo deflazacorte, porém sem o fármaco. Além disso, outras suspensões de nanocápsulas também sem fármaco foram preparadas e secas por aspersão contendo leucina e lactose. Nesse teste nenhum pico cromatográfico foi detectado no tempo de retenção do fármaco (em torno de 3,5 minutos), tanto para a suspensão de nanocápsulas (Figura 1), pó contendo lactose (Figura 2) e pó contendo leucina (Figura 3), concluindo-se que o método é específico para esses fins.

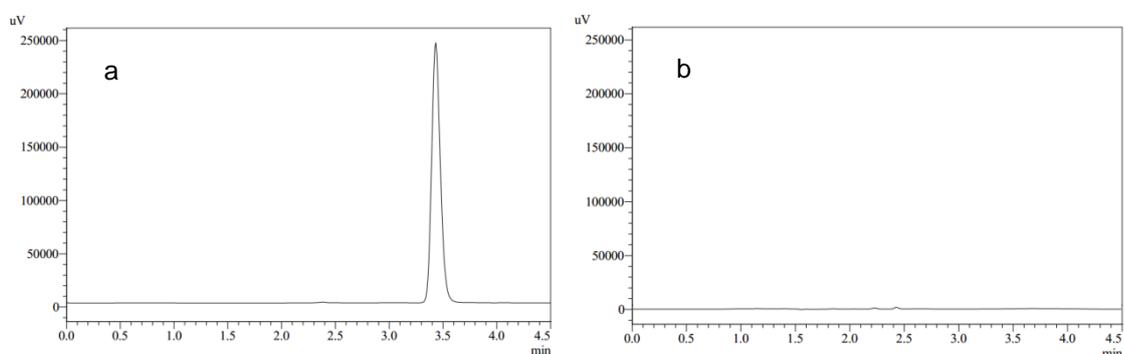


Figura 1: Cromatogramas da a) suspensão de nanocápsulas contendo deflazacorte e b) para suspensão de nanocápsulas sem o fármaco.

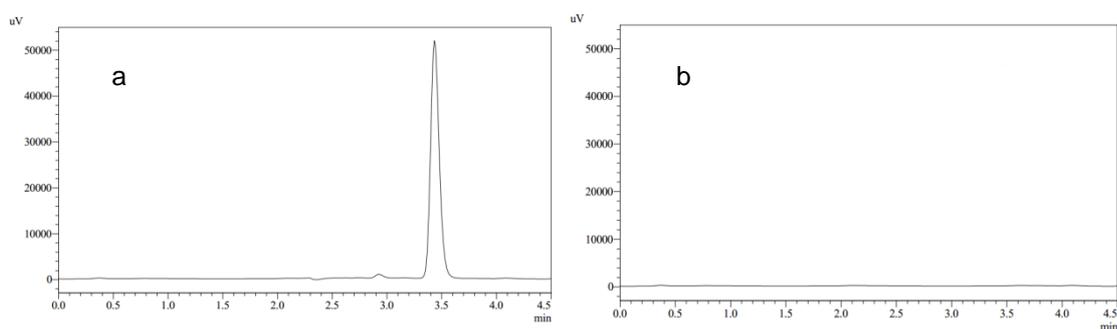


Figura 2: Cromatogramas da a) extração do fármaco a partir do pó preparado com lactose e b) para pó preparado com lactose sem o fármaco.

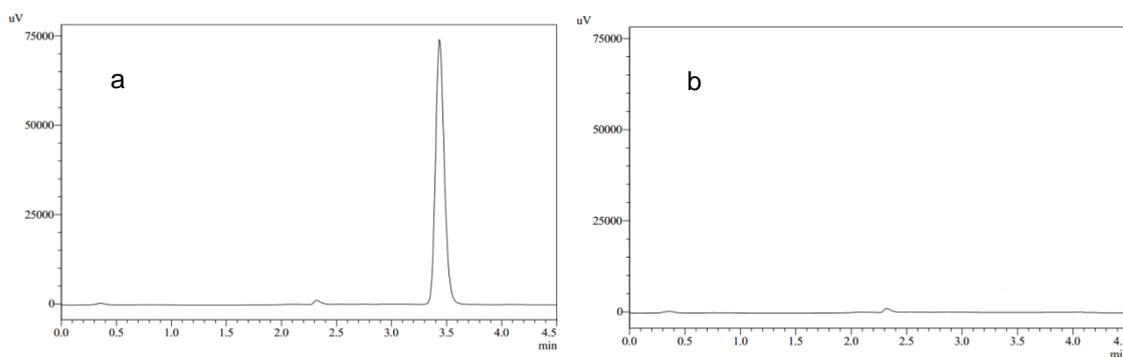


Figura 3: Cromatogramas de a) extração do fármaco a partir do pó preparado com leucina e b) para pó preparado com leucina sem o fármaco.

## 2. Linearidade

Para a avaliação da linearidade, três curvas analíticas foram construídas, com uma faixa de concentração de 5 a 40,0  $\mu\text{g/ml}$ , sendo todas diluições realizadas em fase móvel. Para tanto, foram pesados 0,025 g de fármaco e subsequentemente transferidos para balão volumétrico de 50 ml. Em seguida, foram adicionados 35 ml de acetonitrila ao balão e levado ao equipamento de ultrassom por 30 minutos. Após, o menisco foi aferido com acetonitrila (0,5 mg/ml), onde uma alíquota de 5 ml foi coletada e transferida para outro balão volumétrico de 25 ml, sendo o menisco aferido com fase móvel (0,1 mg/ml). As amostras foram filtradas através de membrana com 0,45  $\mu\text{m}$  de poro (Durapore, Millipore<sup>®</sup>) antes das análises e injetadas no cromatógrafo, registrando-se os valores das áreas. Através da Figura 4 podemos observar que o método é linear, cujos resultados de desvio padrão relativo em cada ponto foram inferiores a 2%.

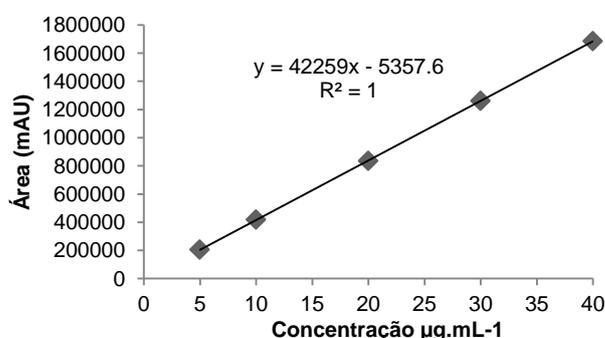


Figura 4: Representação gráfica da média das curvas analíticas (n=3).

### 3. Repetibilidade e precisão intermediária

Na avaliação da repetibilidade para a suspensão de nanocápsulas poliméricas, seis amostras na concentração de 10 µg/ml de deflazacorte foram preparadas. Para tanto, as formulações de nanocápsulas contendo deflazacorte foram diluídas em fase móvel e levadas à extração em banho de ultrassom por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram filtradas em filtro de 0,45 µm de poro (Durapore, Millipore®) e injetadas no cromatógrafo. Para os pós, o mesmo número de amostras foi preparado tanto para as formulações contendo leucina ou lactose, onde primeiramente aproximadamente 20 mg foram diluídas em fase móvel e levadas ao processo de extração em ultrassom sem aquecimento. Após esse processo as amostras foram levadas a centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e diluído em fase móvel para obter a concentração desejada. Então as amostras foram filtradas e injetadas no cromatógrafo. Os resultados desse parâmetro, expressos em desvio padrão relativos (DPR), foram para a suspensão de nanocápsulas (NC) 2,41% e para os pós (NC-DFZ-LEU5 e NC-DFZ-LAC-10) foram 0,5% e 1,51%, respectivamente. A precisão intermediária foi avaliada através da comparação entre as injeções dessa mesma concentração (10 µg/ml) realizadas em dois dias consecutivos, calculando-se posteriormente o DPR dos resultados das determinações.

Os resultados para a precisão intermediária para as formulações avaliadas foram obtidos a partir do cálculo dos valores médios de DPR de cada dia (n=3), conforme Tabela 2.

Tabela 2. Resultados para a precisão intermediária das formulações NC, LEU-5 e LAC-10, demonstrados em valores de DPR.

Dias	NC	NC-DFZ-LEU5	NC-DFZ-LAC10
1	2,40	0,11	1,47
2	2,39	0,63	1,52
3	2,36	0,73	1,53

Para ambos os estudos os valores de desvios padrões relativos foram inferiores a 5 %, conforme preconizado pela RE 899 (ANVISA), demonstrando repetibilidade e precisão intermediária adequadas para o método analítico em questão para as formulações testadas.

#### 4. Exatidão

Esse parâmetro foi avaliado adicionando-se uma quantidade conhecida de fármaco, a partir de uma solução mãe, a uma amostra sem fármaco das formulações NC, NC-DFZ-LEU5, NC-DFZ-LAC10. As concentrações utilizadas para o teste de exatidão foram de 7, 20 e 35 µg/ml. Os resultados estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados para exatidão das formulações NC, NC-DFZ-LEU5 e NC-DFZ-LAC10. Os resultados estão demonstrados em valores de porcentagem de fármaco recuperado.

Adicionado (µg/ml)	NC	NC-DFZ-LEU5	NC-DFZ-LAC10LAC-10
7	94,39 ± 0,35	107,15 ± 0,56	99,23 ± 1,84
20	94,75 ± 0,50	94,20 ± 1,62	99,50 ± 0,87
35	93,16 ± 0,57	93,29 ± 2,22	94,86 ± 1,50

Os resultados na tabela acima demonstram que o método analítico pode ser caracterizado como exato, segundo os preceitos da *International Conference on Harmonization* (2005) e RE 899 (ANVISA).

#### 5. Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados utilizando as equações 1 e 2 através da relação entre o desvio padrão da curva de calibração e sua inclinação, usando o fator multiplicador sugerido pela norma da *International Conference on Harmonization* (2005).

$$LD = 3,33.DP/A \quad \text{Equação 1}$$

$$LQ = 10.DP/A \quad \text{Equação 2}$$

onde LD é o limite de detecção, LQ o limite de quantificação, DP o desvio padrão da curva de calibração e A o coeficiente angular da reta de calibração. Os valores encontrados para os limites de detecção e quantificação foram de 0,24 µg/ml e 0,72 µg/ml, respectivamente.

## Referências

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Q2A Guideline Validation of analytical procedures: definitions and methodology, 2005.

RESOLUÇÃO RE nº 899, de 29/05/03, da ANVISA – Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos.

SCREMIN, A.; PIAZZON, M.; SILVA, M.A.S.; KUMINEK, G. CORREA, G.M.; PAULINO, N.; CARDOSO, S.G. Spectrophotometric and HPLC determination of deflazacort in pharmaceutical dosage forms. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 281-287, 2010.